

**Die Wirkung von Bakterien und Hefen
auf Gewebekulturen in vitro.**

Heide Putzar

Die Wirkung von Bakterien und
Hefen auf Gewebekulturen in vitro.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München.

Vorgelegt
von
Heide Putzar
aus
Lauban / Schlesien.



Juli 1957.

Berichterstatter :

1. Professor Dr. A. Koch

2. Professor Dr.K. Ritter von Frisch

Tag der mündlichen Prüfung : 31. Juli 1954

Einleitung	1
I. Der Einfluß von Bakterien auf Fibroblasten	
in der Gewebekultur	2
Literatur	2
Material und Methode	12
Versuchsordnung	18
Verarbeitung der Gewebe	19
Experimenteller Teil und Diskussion der Ergebnisse	20
Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums durch:	
A. Escherichia paracoli	20
B. Pseudomonas pyocyaneum	31
C. Bacterium faecalis alcaligenes	37
D. Bacterium proteus	46
E. Bacillus subtilis	51
F. Bacterium aerobacter aerogenes	57
II. Der Einfluß von Pilzen auf Fibroblasten in	
der Gewebekultur	63
A. Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums	
durch nichtsymbiotische Hefen;.....	64
1. Candida albicans	64
2. Torula utilis	71
B. Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums	
durch die symbiotischen Hefen von Bockkäfern;.....	79
1. Rhagium bifasciatum	81
2. Spondylis buprestoides	86
Schlußbetrachtungen	96
Zusammenfassung	100
Literatur	102

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Der Einfluß, den Mikroorganismen auf explantierte Zellen und Gewebe auszuüben vermögen, ist seit langem ein interessantes Untersuchungsobjekt vieler Disziplinen, der Biologie beispielsweise, weil sie in der Symbiose von Hefen und niederen Tieren bedeutsame Stoffwechselvorgänge erkennen konnte, der Medizin, weil sie Einblick bekam in Ätiologie, Diagnostik und Therapie vieler Krankheiten, der Biochemie, die für viele biologische Vorgänge eine stoffliche Grundlage geben konnte, der Morphologie, die in die Lage kam, den Einfluß formgebender Reize am Erfolgsorgan darzulegen. Dies Problem ist auch weiterhin sehr aktuell, es sei nur erinnert an die großangelegten Versuche durch Mikroorganismen, bzw. deren Stoffwechselprodukte (Antibiotica), das maligne Wachstum selektiv zu hemmen. Beiträge zur Kenntnis dieses Forschungsgebietes auf breiterer Grundlage, als nur im speziellen Fall, scheinen durchaus angebracht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit will ich aus dem praktisch fast unübersehbar gewordenen Gebiet einen sehr speziellen Sektor auswählen, indem ich das Verhalten von explantierten und reingezüchteten Bindegewebszellen gegenüber einer Reihe von Bakterien und Hefen analysiere, dabei einerseits die morphologischen Veränderungen an den Bindegewebszellen beobachte, andererseits gleichzeitig nach Korrelationen zu Wachstumseffekten suche, indem ich das Wachstumsareal der gezüchteten Gewebe so exakt wie möglich quantitativ erfasse.

Als Vertreter der Bindegewebszellen verwendete ich Fibroblasten embryonaler Hühnerherzen. Sie sind bekanntlich die meistuntersuchten Objekte in der Gewebezüchtung. Sie dienen

als Festobjekt bei unzähligen Fragestellungen der verschiedensten Richtungen. Ihr morphologisches Verhalten ist weitgehend bekannt. Ihre Züchtung vom Ausgangsgewebe bis zu den reinen Zellen bietet dem Künner wenig methodische Schwierigkeiten.

Von den Mikroorganismen, deren Einfluß ich untersuchen will, wählte ich eine Reihe häufig vorkommender biologisch bedeutsamer, doch im allgemeinen apathogener Bakterien. Es sind dies: *Bacterium proteus*, *Pseudomonas pyocyaneum*, *Escherichia paraceli*, *Bacterium fascialis alcaligenes*, *Bacterium aerobacter aerogenes* und *Bacillus subtilis*; ferner einige Pilze, die eine bestimmte Affinität zu tierischen Geweben haben, deren Auftreten unter Umständen Ausdruck eines pathologischen Zustandes sein können: *Candida albicans* und *Torulopsis utilis*; schließlich einige Hefen, deren Vorkommen mit tierischem Leben eng verbunden ist: Symbiosehefen, welche von P. B u c h n e r (1) und A. K e o h (2-5) und Mitarbeitern in den Mycetomen, Darmblindsäcken oder bestimmten Darmabschnitten niederer Tiere gefunden und reingezüchtet wurden.

I. DER EINFLUSS VON BAKTERIEN AUF FIBROBLASTEN IN DER GEWEBEKULTUR:

Die Kenntnis einer Beeinflussung von Fibroblasten durch Mikroorganismen ist eigentlich so alt wie die Methode der Gewebezüchtung selbst. Es ist eine altbekannte Tatsache, dass selbst unter Einhaltung aller Kautelen sterilen Arbeitens gelegentlich Luftkeime die Gewebekulturen infizieren. Diese zufälligen Beobachtungen gaben dann Anlaß zu einer systematischen Untersuchung des Verhaltens von Gewebekulturen bei Befall mit Mikroorganismen. Dabei wurden in verschiedener Weise die Art des gesüchteten Gewebes und die Wahl der Mikroorganismen variiert. Bei diesen Untersuchungen lag das Schwergewicht auf der Morphologie der Gewebekulturen unter den veränderten Be-

dingungen.

H.F. S m y t h (1915) (6-9) war der erste, der nach den grundlegenden Versuchen C a r r e l s (10) den wechselseitigen Einfluß von Bakterienkulturen und Fragmenten von Hühnerherzen oder Milz studierte.

S m y t h fand, dass Gewebezellen eine gewisse baktericide Wirkung entfalten, besonders bei unmittelbarem Kontakt der Gewebezellen mit Bakterien. Um die Gewebestücke war dann eine bakterienfreie Zone zu beobachten. - Einzelne Bakterien: *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella typhi* und *Streptococcus aureus* übten eine hemmende Wirkung auf die Zellenvermehrung aus. *Corynebacterium diphtheriae* beeinflusste das Gewebe weniger, *Bacterium prodigiosus* übte überhaupt keinen Einfluß aus. Dagegen schien die Anwesenheit durch Hitze abgetöteter Bakterienleiber das Wachstum von Gewebekulturen günstig zu beeinflussen. *Mycobacterium tuberculosis* (11) wurde in Milzkulturen phagocytiert, ohne, daß sie zur Vermehrung kamen. Um Bakterienhaufen sammelten sich zunächst lymphocytäre Elemente, später ein- und mehrkernige Parenchymzellen, welche nach Phagocytose der *Mycobacterien* zu typischen Riesenzellen verschmolzen. Auffallend war dabei, dass die Bakterien teils in den Zellen verdaut wurden, teils aber darin zur Vermehrung kamen und ein Absterben derselben zur Folge hatten. Leider erfahren wir nichts Genaueres über das endgültige Schicksal solcher Gewebekulturen.

Der Ansicht von S m y t h, daß das Plasma des Kulturmediums bactericide Wirkung besitzt, könnte man entgegenhalten, daß die Wachstums hemmung auf einen Nährstoffmangel des Substrates zurückzuführen ist. Durch das zugefügte Gewebe wird derselbe dann behoben, sodaß nunmehr eine Vermehrung der inokulierten Keime möglich ist.

Ähnlich wie H.F.S m y t h beschäftigte sich J. T a n n e n b e r g (12) 1930 mit dem Verhalten von Fibroblastenreinkulturen bei bakterieller Infektion. T a n n e n b e r g ging dabei von einer Fragestellung aus, die vor ihm eine Reihe anderer Gewebzüchter bewegte, nämlich, ob eine Umwandlung von

Fibroblasten in Makrophagen möglich sei (siehe dazu A. F i - s c h e r 1927 (13)). Er glaubte diese Frage verneinen zu müssen und lieferte den experimentellen Beweis durch eine sorgfältige histologische Prüfung von mit Bakterien infizierten Fibroblasten. Hier interessiert nicht die Tannenberg'sche Fragestellung, sondern seine Befunde an infizierten Fibroblastenkulturen. Nach T a n n e n b e r g besteht die Wirkung einer solchen Infektion besonders in einer Wachstumshemmung, welche stärker oder schwächer sein kann, je nach dem Infektionsgrad der Kultur durch die Bakterien. Die Fibroblastenzellen wachsen dann nicht mehr in dichtem Verband, sondern der Wachstumshof ist locker gebaut und auffallend weitmaschig. Die Wachstumshemmung kann aber auch oft nur eine einseitige sein, wenn die Bakterien in geringer Zahl nur an dieser Seite der Fibroblastenkultur lagen.

Die Ursache für ein schlechtes Wachstum von Gewebekulturen führte Tannenberg auf eine latente Wildinfektion zurück, die sich dann erst zeigt, wenn die Fibroblasten bereits eine gewisse Größe erreicht haben. Als weitere Wirkung der Infektion wies Tannenberg auf eine Reihe von Zellschädigungen hin, von denen folgende als besonders markant beschrieben werden: Degenerationerscheinungen, wobei sich viele freie Zellen aus dem Zellverband lösen, Entstehung "freier Rundzellen" mit allen dazu führenden Übergangsformen; ferner degenerative Verfettungen, nekrobiotische Kernveränderungen mit allen Stadien des Kernzerfalls. Die Frage einer Phagocytose von Bakterien durch Fibroblasten wurde von Tannenberg gestreift und abgelehnt. Es wurde angenommen, daß die Bakterien in die Fibroblasten einwachsen und sie dann ausfüllen.

Tannenberg untersuchte den Einfluß lebender, intakter Bakterien auf die Gewebekulturen. Die nachstehend zitierten Autoren interessierten ^{sich} lediglich für die Bakterientoxine: R. K i m u r a (14) und T. I s c h i i arbeiteten mit Bakteriengiften von den 15 folgenden Bakterienarten: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A und B, *Pasteurella bipolare* (der Erreger der Hühnercholera), *Escherichia coli*

Clostridium tetani, *Corynebacterium diphtheriae*, drei Arten Dysenteriebacillen, Choleravibrionen, Staphylo-, Meningo-, Pneumo- und haemolytische Streptococcen. Die Bakteriengifte gewannen sie von 10 Tage^{lang} bebrüteten Bakterienkulturen mittels Filtration durch ein Berkefeldfilter. Für die Versuche wurden verschiedene Konzentrationen der Giftlösung verwendet. Als Gewebe wurden Herz- und Milzstückchen von Hühnerembryonen, sowie reine Fibroblasten verwendet. Besonderes Augenmerk legten die Verfasser auf das Wachstum und die histologischen Veränderungen der Fibroblasten. Besonders wachstumshemmend erwiesen sich auf frisch angesetzte Gewebe das *S. paratyphus* A-Gift; weniger giftig waren *S. paratyphus* B- und Hühnercholeraeigifte. Staphylococcen und Meningococcen verursachten in der Gewebekultur keine Wachstumshemmung. Zwischen den Fibroblasten des Herzens und der Milz war kein deutlicher Unterschied in der Giftempfindlichkeit festzustellen. Bakterienkulturenfiltrate wurden zu frisch angesetzten Geweben und zu 24 bis 48 Stunden alten Fibroblastenkulturen zugegeben. Bei Zugabe von *S. paratyphus* B-Toxin zeigten besonders die an der Peripherie der Kultur liegenden Zellen deutliche morphologische Veränderungen; sie verloren mit der Zeit ihre scharfen Konturen, enthielten lichtbrechende Granula, blähten sich auf und kugelten sich schließlich ab. Mit Hilfe der Flaschenmethode gelang es den Autoren, Beziehungen zwischen der Giftkonzentration und dem Wachstum der Fibroblasten darzustellen. So ist z.B. bei Zusatz von *S. paratyphus* B- Gift bis zur 5-fachen Verdünnung kein meßbares Wachstum der Fibroblastenkulturen erkennbar (bei Anwendung der planimetrischen Methode), bei 15-facher Verdünnung dagegen war kein Unterschied zu den Kontrollen zu bemerken. Bei anderen Bakteriengiften wurde dieses Ergebnis schon bei geringerer Giftlösungsverdünnung erreicht. Bei Zusatz von "Originalgiftlösung" konnten die Autoren feststellen, daß die Schädigung bzw. Wachstumshemmung parallel der Giftintensität der Bakterien laufen.

1932 erarbeitete R. M e i e r (15) "Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Stoffwechselprodukten lebender Bakterien auf Wachstumsvorgänge von Gewebekulturen", bei der ein Kontakt

der Bakterien mit den Zellen vermieden und eine quantitative Wachstumsmeßung neben morphologischer Beobachtung möglich sein sollte. M e i e r glaubte dieses Ziel erreicht zu haben, indem er in die Carrelflaschen ohne die übliche flüssige Phase züchtet ("Trockenflaschen"). Auf dem festgewordenen Kulturmedium können die Bakterien wie auf der Agarplatte ausgestrichen werden. Sie bleiben so am Ort des Ausstriches fixiert.

Bei Einwirkung von Staphylococcen konnte M e i e r an der, der Bakterienkolonie zugekehrten Seite der Gewebekultur einen schmäleren Wachstumshof als auf der anderen Seite erkennen. Außerdem sahen die Versuchskulturen grobmaschiger aus, die Zellen waren plumper (infolge einer fettigen Degeneration).

Bei Beimpfung des Kulturmediums mit Pneumococcen zeigten die Versuchskulturen eine scharfe Begrenzung des Wachstums an der den Pneumococcen zugekehrten Seite, während die andere Seite sich vollkommen normal verhielt. An der Seite der Hemmung sind die Zellen etwas granuliert, aber nicht so stark geschädigt wie bei der Staphylococceneinwirkung.

In einer späteren Arbeit (1934) befaßte sich R. M e i e r (16) mit einer Untersuchung: "Über den Einfluß von Bakteriengiften auf isolierte Zellen und Gewebe". Er stellte sich dabei die Aufgabe, eine differenzierte Wirkung von Bakterien an solchen Zellarten aufzufinden, welche die Hauptrolle bei den Zellreaktionen auf bakterielle Einwirkung im tierischen Organismus spielen, nämlich die leucocyitären Elemente des Blutes und die Elemente des Bindegewebes. M e i e r fand eine grundlegend verschiedene Reaktion dieser beiden Zellarten.

Bei Leukocytenkulturen stellte M e i e r eine positive Chemotaxis und eine Erhöhung der Auswanderungsgeschwindigkeit fest. So bei Einwirkung von Staphylococcen, Escherichia coli und Pneumococcen, nicht dagegen bei Mycobacterium tuberculosis und einigen Spirillen. R. M e i e r macht ferner auf die Erscheinung aufmerksam, daß die Bakterien das Kulturmedium in ungleichem Maße verflüssigen und daß diese Erscheinung von ausschlaggebender Bedeutung für die Art des Wachstums der Bindegewebszelle sein dürfte.

R. M e i e r fand, daß die Fibroblastenkulturen auf die Beimpfung mit Bakterien völlig anders reagieren; alle Fibroblasten wurden von den Bakterien überwuchert und abgetötet, wobei allerdings die Zerstörung des gerüstbildenden Gerinnsels einerseits, sowie andererseits die Einbuße von Nährmaterial von Bedeutung sein kann. Niemals konnte R. M e i e r beim Zusammenbringen von Bakterien mit Fibroblasten eine erhöhte Aktivität der Fibroblasten sehen.

Bei einem Teil der untersuchten Bakterien konnte er eine Reihe von spezifischen Wirkungen feststellen, die durch Stoffwechselprodukte der betreffenden Bakterien hervorgerufen wurden, bei anderen Bakterien dagegen nicht. So hatte *M. tuberculosis*, auch in großer Menge, kaum einen nennenswerten Effekt, die Wirkung scheint durch direkten Kontakt, vielleicht durch "Symbiose" mit den Zellen, ausgelöst werden zu können. Ebenso produzierte *Escherichia coli* kaum Stoffe, die Fibroblasten schädigen. Anders verhielten sich Coccen (bei dieser Untersuchung wurden wieder Trockenflaschen verwendet). Bei Staphylococcen war das Gewebewachstum etwas geringer als bei der Kontrolle, und die Kulturen zeigten ein plumptes Aussehen durch Verfettung, besonders auf der den Bakterien zugewandten Seite. Bei Streptococcen und Pneumococcen dagegen kam es zu einer starken Auswanderungs- und Wachstumshemmung, die besonders eindrucksvoll bei Pneumococcen war. Nach einiger Zeit wurden die Kulturen vom Rande her aufgelöst.

R. M e i e r warf auch die Frage nach der Art der Bakterienwirkstoffe auf. Er verwendete Flaschen, in denen Bakterien und Zellen durch Membranen verschiedener Porengrößen getrennt waren. Auf Grund dieser Versuche bekam R. M e i e r den Eindruck, daß die Wirkung durch schwer diffundierende Stoffe, vermutlich kolloidaler Natur, hervorgerufen wurde.

1930 stellten R. K i m u r a und T. I s c h i i (17) Versuche an, über die "Gewöhnung der Fibroblasten an Bakterien- und Schlangengifte (Studien in der Gewebesüchtung)" und fanden dabei, dass sich die Fibroblastenkulturen vom Huhn an Paratyphustoxin und Schlangengifte allmählich gewöhnen, sodaß sie in späteren Passagen schneller wachsen als anfangs.

Wie H.F. Smyth, R.Kimura und Ischii widmete sich auch A.Krontowski (18) quantitativen Untersuchungen über die Wirkung des Diphtherietoxins auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Gewebekulturen. Er fand, daß Diphtherietoxin auch in starker Verdünnung (z.B. 1 : 100.000 und 1 : 1.000.000) eine bedeutende, quantitativ abschätzbare, zwar hemmende Wirkung auf die Gewebekulturen ausübt, wie anhand von Wachstumskurven gezeigt werden konnte. Gewebeschädigungen durch Diphtherietoxin, gemessen am Wachstumsstillstand, konnten jedoch nach Erneuerung des Mediums oder nach Umsetzen der Gewebe weitgehend wieder ausgeglichen werden, d.h. die Versuchskulturen glichen sich wieder den Kontrollen an. Bei der Untersuchung des Stoffwechsels der Versuchsgewebe fand Krontowski eine starke Hemmung sowohl des Zuckerverbrauches, als auch der Milchsäurebildung. Eine histologische Auswertung der Versuche, nahm Krontowski nicht vor.

1935 untersuchte G. Wallbach (19) "die reaktiven Erscheinungen an der menschlichen Leukozytenkultur auf Grund einiger Infekte". G. Wallbach setzte den Kulturen abgetötete *M.tuberculosis*, *Pneumococcen* und *Corynebacterium erysipeloethrix rhusiopathiae* (= Rotlaufbakterien) zu und legte besonders Augenmerk auf die Bakterienaufnahme in die Zellen und die Beantwortung des Bakterienreizes durch die Zellen. Bei Zusatz von *M.tuberculosis* konnte der Verfasser epitheloide, sowie riesenzellähnliche Verbände mit eingeschossenen *M.tuberculosis* beobachten. An diesen Bakterien wurden Veränderungen festgestellt, wie sie Smyth beobachtet hat.

Auch zugesetzte Rotlaufbakterien wurden phagocytiert, genauso *Pneumococcen*. Außerdem ist beim Zusatz abgetöteter *Pneumococcen* bemerkenswert, daß es zu Zusammenlagerungen von Zellen kommt, wie sie bei Infektion mit *M.tuberculosis* beobachtet wurden.

H. Vollmar und H.Knöll (20) beschäftigten sich in ihrer 1944 veröffentlichten Arbeit mit "Untersuchungen über die Wirkung von Bakterien und Bakteriophagen-Präparaten auf Carcinom- und Normalgewebe in der Gewebekultur". Sie ließen

Filtrate und Lysate von Bakterien und den dazu gehörigen Phagen oder Bakterienfiltrate allein auf Carcinom- und Normalgewebe einwirken. Dabei verweilten die Gewebestückchen vor dem Ansetzen längere Zeit in den betreffenden Lösungen, oder sie wurden erst nach dem Ansatz mit diesen überschichtet. Die Verfasser stellten fest, daß das Carcinomgewebe durch diese Filtrate und Lysate mehr oder weniger geschädigt wurde, sei es, daß eine vollständige Wachstums hemmung oder Abtötung erfolgte, während das Normalgewebe in keiner Weise geschädigt wurde. Als besonders wirksam erwiesen sich Bakteriophagenly-sate und zwar vom *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus dysenteriae*, *Streptococcus ovalis* und dem *Streptococcenstamm* SG 104. Auch Filtrate von Darmbakterien aus Mäusen mit schlecht-wachsendem Impftumor wirkten in diesem Sinne. Durch Kochen der Bakterienstämme konnte diese Wirksamkeit gesteigert werden, (mit Ausnahme des *Bacillus subtilis*). Bei dem Zusatz der erwähnten Filtrate zu gutwachsenden Gewebekulturen von Normal- und Tumorgewebe beobachteten die Verfasser bei den Tumorgeweben Abrundung der Zellen, Auftreten von Vakuolen und Granula im Plasma und letzten Endes Auflösung und Zerfall, während das Normalgewebe nicht geschädigt wurde. Diese sehr bemerkenswerten Ergebnisse fanden leider keine weitere Beachtung. Sie dürften im Zusammenhang mit neueren Untersuchungen über die Beeinflussung von Tumorgeweben durch Bakterienstoffe wieder an Bedeutung gewinnen. Die Problematik solcher Untersuchungen (Vollmar und Knöll) liegt in der Frage, ob es in den Bakterienfiltraten (-lysaten) echte Toxine gibt, welche die Tumorexplantate stärker schädigen als die Normalgewebsexplantate, oder ob es sich um einen ganz allgemeinen unspezifischen Ausdruck der stärkeren Empfindlichkeit der Tumorgewebe gegenüber Milieuänderungen handelt.

Einen großen Umfang nehmen Arbeiten ein, die das Gebiet der Tuberkulose betreffen. Es lag sehr nahe, daß man auf Bindegewebszellen *M.tuberculosis* oder deren Gifte einwirken ließ, um Kenntnisse zu bekommen, inwieweit die Wirkungen von *M.tuberculosis* in vitro in vivo gleichen, d.h. also z.B., ob formgebende oder gewebeschädigende Reize entfaltet werden. Diese Arbeiten, die ich hier nur kurz zitierte, bieten für die eigene Fragestellung im engeren Sinn nichts wesentlich Neues und decken

sich im Prinzip mit den oben erwähnten Referaten. Aus der großen Zahl der Autoren, welche sich mit dem Einfluß von *M.tuberculosis* auf Gewebekulturen befaßten, seien nur einige wenige genannt:

A. Maximow (21), A.Fischer (22), A.D. Timofeevskii (23-24), A.D. Timofeeskii und S.V. Benevolenskaja (25-29), D.T. Smith, H.S. Willis and Lewis M.R. (30), E. Haagen (31), W.H. Lewis and L.T. Webster (32), W.H. Lewis (33 und 34), M.R. Lewis, H.S. Willis and W.H. Lewis (35), H. Catrén (36), J.D. Aronson (37), E.M. Vermeel (38), M. Allgower und Bloch H. (39), H.F. Smyth (7), K. Meier (12), G. Wallbach (15).

Zur Untersuchung gelangten hauptsächlich Fibroblasten- und Leukocytenkulturen.

Einige der genannten Autoren geben den Umbau der kultivierten Zellen zu typischen Epitheloidzellen und sogar zu Riesenzellen an; andere dagegen bestritten dies. Umstritten ist auch die Frage der Phagocytose von *M.tuberculosis*. Auch hier glauben mehrere Autoren, eine echte Phagocytose von *Mycobacterium tuberculosis* gesehen zu haben.

Zusammenfassend läßt sich sagen: In der Gewebekultur werden die Fibroblasten in der Regel mehr oder weniger durch die Bakterien geschädigt und zwar verschieden stark, je nach der Art des Bakteriums. Der Hemmungseffekt äußert sich ferner darin, daß die Fibroblasten nekrobiotischen Veränderungen unterliegen, die schließlich zu einer völligen Auflösung der Kulturen führen. Die Bakterien bleiben dabei weitgehend virulent. Die Feststellung H.F. Smyth's, daß die Bakterien geschädigt werden und die Gewebekultur irgendwie baktericid wirkt, muß daher als umstritten gelten.

Die Analyse der Wachstumshemmung läßt die Deutung zu, daß Bakterienstoffwechselprodukte das wachstumshemmende Agens sind. Eine nähere biochemische Charakterisierung solcher Stoffe ist aber nicht versucht worden oder nicht geglückt.

Die verschiedentlich diskutierte Frage, ob durch eine Einwirkung durch Fremdkörper, Bakterien und deren Gifte auf die

Fibroblastenzelle ein formativer Reiz ausgeübt wird (z.B. Tuberkelbildung), ob ferner eine Phagocytose vorkommt und eine Umwandlung (?) von Fibroblasten in Makrophagen, wurde von den meisten Autoren verneint, von einigen aber auch für möglich gehalten.

Bei meinen eigenen einschlägigen Versuchen, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden sollen, waren für mich folgende Gesichtspunkte maßgebend:

- 1.) Die Ausdehnung der Untersuchungen auf verschiedene, bisher nicht untersuchte Bakterienarten, dabei Nachprüfung von Befunden anderer Autoren.
- 2.) Die Absicht, die Untersuchungen auf eine quantitative Basis zu stellen, indem das Flächenwachstum der Fibroblastenkulturen gemessen wird.
- 3.) Eine histologische Beurteilung und Beschreibung jedes Versuches.
- 4.) Es sollte festgestellt werden, ob die Stoffwechselprodukte der Bakterien (Toxine) oder Enzyme eine schädigende Wirkung auf die Fibroblasten ausüben, oder ob die Wachstums- hemmung nicht einfach auf den Nahrungsentzug durch die Bakterien in der Kultur zurückgeführt werden muß.

MATERIAL UND METHODE.

Für meine Untersuchungen verwendete ich Reinkulturen von Hühnerherzfibroblasten. Sie wurden aus dem Herzen ca. 9-tägiger Hühnerembryonen gewonnen und in der üblichen Weise (siehe z.B. I. F i s c h e r (40), A. F i s c h e r (41) oder B a u e r (42)) im optimalen Medium für Fibroblasten gezüchtet.

Dieses optimale Medium setzt sich folgendermaßen zusammen: $\frac{1}{3}$ Vol. Hühnerplasma und $\frac{2}{3}$ Vol. Embryonalextrakt, der für Deckglaskulturen 3:7 und für Flaschenkulturen 1:10 mit Tyrodelösung verdünnt wurde. Die dem festen Medium überschichtete flüssige Phase besteht ebenfalls aus 1:10 verdünntem Embryonalextrakt. Über die Bedeutung des Embryonalextraktes und Plasmas in dem normalen optimalen Nährmedium als Nährstoffquelle und Stütz- oder Gerüstobjekt ist in den einschlägigen Arbeiten (40-42) nachzulesen.

Als Kulturgefäße für die Versuche wurden die üblichen Carrelflaschen und abgeänderte Carrelflaschen nach J. B a n d i e r und H. B a y e r l e (43) verwendet, die so konstruiert sind, daß der Kulturraum durch eine halbdurchlässige Membran unterteilt werden kann. In erwünschten Fällen können die Fibroblastenkulturen dann von dem zu untersuchenden Material getrennt werden. Diese Cellophanmembranflaschen, hier kurz "Membranflaschen" genannt, setzen sich aus drei Teilen zusammen: einer oben offenen Carrelflasche, a) einem Glaszylinder b) und einem Deckel c). Der Glaszylinder, der in die Carrelflasche hineinhängt, wird unten mit einer semipermeablen Membran bespannt, auf der die Kultur angesetzt wird. Die zu untersuchende Substanz pipettiert man durch den Flaschenhals unter die Membran, sodaß die Membran mit den auf ihr wachsenden Kulturer in die Substanz eintaucht.

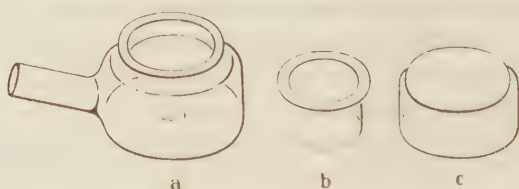


Abb. 1 Cellophanmembranflasche nach Bandier und Bayerle.

Eine solche räumliche Trennung kann häufig von Vorteil, in manchen Fällen sogar unumgänglich notwendig sein, so z. B. wenn die zu untersuchenden Keime die Kulturen überwuchern, oder wenn sie das Kulturmedium verflüssigen, oder

ihr schädigender Einfluß bei direkter Berührung mit der Kultur zu stark ist.

Außerdem bietet dieses Kulturgefäß mit einer Cellophanmembran gekannter Porengröße die Möglichkeit zu beurteilen, ob ein sich eventuell bemerkbar machender Wachstumseffekt auf der Anwesenheit nieder- oder hochmolekularen Verbindungen beruht.

Im Prinzip werden bei beiden Flaschentypen die Kulturen in gleicher Weise angesetzt. Zunächst pipettiert man das Plasma in das Gefäß, setzt die Kulturen ein, gibt den Embryonalextrakt dazu, rührt gut um und läßt gerinnen, dann überschichtet man diese feste Phase mit Embryonalextrakt = der flüssigen Phase. Den Membranflaschen setzt man nun anschließend noch das zu untersuchende Substrat u n t e r der Membran zu. Die für meine Untersuchungen verwendeten Bakterienreinkulturen, für deren Überlassung ich Herrn Dozent Prof. Dr. Kanz vom Hygienischen Institut der Universität München zu Dank verpflichtet bin, wurden auf dem üblichen Nähragar gezüchtet.

Die Symbionten (57), für deren Beschaffung ich Herrn ProfDr. A. Koch vom Zoologischen Institut der Universität München danke, wurden ebenfalls teils auf Nähragar, teils auf Nähragar mit Zusätzen kultiviert.

Allgemeines über Hühnerherzfibroblastenkulturen.

Wie schon oben erwähnt, wurden für die Untersuchungen Reinkulturen von Hühnerherzfibroblasten verwendet. Als rein sind die Kulturen dann zu betrachten, wenn bei der mikroskopischen Durchmusterung keine Blut-, Herzmuskel-, Endothel- und Epithelanteile mehr beobachtet werden können, was nach ca. 5-6 Passagen der Fall ist. Abb. 2 zeigt einen Ausschnitt aus einer Fibroblastenreinkultur und Abb. 5a und 5b einige normale Fibroblastenzellen.

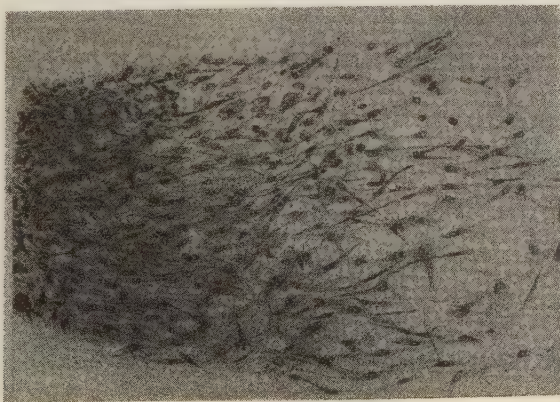


Abb. 2 Sektor aus einer Fibroblastenreinkultur
(Abb. n. K. Bauer 1929).

Die Fibroblastenzelle kann verschiedene Formen zeigen (Rumjantzew (44)) : flache, stark ausgebreitete z.T. sternförmige Zellen mit vielen Ausläufern und langgezogene schmälere Formen. Außerdem beobachtet man in nährstoffarmen Medien und bei gewissen Schädigungen extrem schmale, dürrtische sehr spitz zulaufende Fibroblasten, ohne seitliche Ausläufer, die ich "Hungerfibroblasten" nennen möchte. (



Abb. 3 Schematische Darstellung der verschiedenen Formen- und Größenvariabilität der Fibroblasten (135-fache Vergrößerung) Erklärung im Text.

Wie aus Abb. 2 und 3 zu erkennen ist, ist die Größenvariabilität der Fibroblasten in der Kultur bedeutend. Zum Teil beruhen die Größenunterschiede auf der verschiedenen starken Expansion der Zellen, die ihre Ausläufer einziehen und sich abkugeln können; teils sind sie auf Wachstumsunterschiede zurückzuführen.

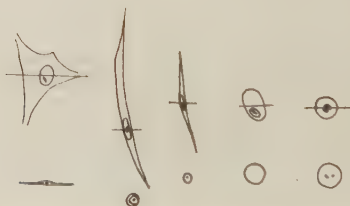


Abb. 4 Schematische Darstellung verschiedener Zellformen und ihrer Querschnitte (135-fache Vergrößerung) Erklärung im Text.

Abb. 4 zeigt einige Querschnitte solcher Zellformen. An ihnen wird deutlich, daß die breiten Zellen ganz platt ausgestreckt im Medium liegen, während die abgekugelten Formen einen fast kreisförmigen Querschnitt zeigen. An gefärbten Präparaten sind, infolge der starken Ausdehnung, die platten, großen Zellen immer ganz hell; die Hungerfibroblasten und Rundzellen sind dichter und daher stärker färbbar.

Abb. 5 a

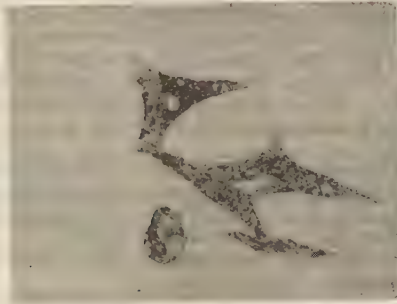


Abb. 5 b

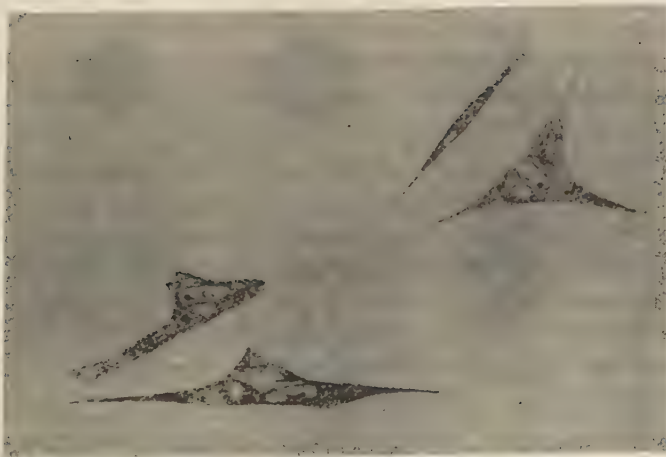


Abb. 5 a und 5 b: Darstellung normaler Fibroblasten bei 340-facher Vergrößerung.

Die Abweichungen von der Durchschnittsgröße können mit der Gauß'schen Kurve dargestellt werden. Die Ursache für die verschiedenen Zellformen ist in den unterschiedlichen Spannungsverhältnissen des Mediums zu suchen. In der Richtung der stärksten Spannung liegen die Zellen in parallelen Strängen dicht nebeneinander und haben eine langgestreckte spitz zulaufende Form. - In spannungsarmen Zonen dagegen bilden die Fibroblasten ein lockeres Maschenwerk von unregelmäßiger Gestalt. Sie sind hier platt und ausgebreitet und strecken breite Pseudopodien aus. - Abgekugelte Formen entstehen, wenn den Fibroblasten das Fibringerüst genommen wird.

Die Wachstumsperiode der Fibroblastenkultur beträgt bei einer Bebrütungstemperatur von 37°, 48 - 72 Stunden, ganz gleich, welches Züchtungsgefäß verwendet wird. Züchtet man auf dem Deckglas, muß die Kultur nach Ablauf dieser Zeit in üblicher Weise in ein neues Nährmedium umgesetzt werden. Falls man dies unterläßt, stellen sich Degenerationserscheinungen ein. (Rumjantzew (44), Kimura (45)). Die beginnende Degeneration äußert sich dadurch, daß die Zellen ihre Vermehrung einstellen, auseinanderrücken, unter Einziehung ihrer Ausläufer abrunden und dabei in tiefere Schichten des Kulturmediums sinken. Im Zellplasma tritt eine Anhäufung von Granula und Vakuolen und zunehmende Verfettung auf.

Der typische Degenerationsprozess (46,47,48) äußert sich zuerst an den Kernen. (Abb. 6)

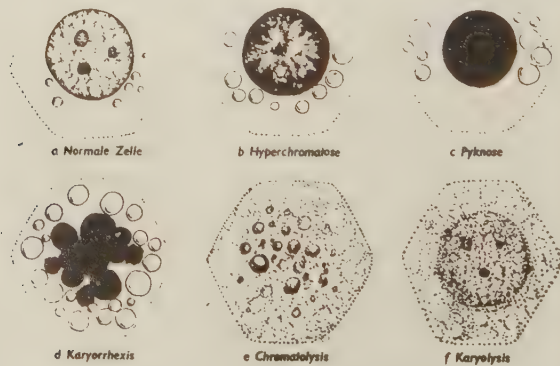


Abb. 6: Schematische Darstellung nekrobiotischer Kernveränderungen (nach Ries - Gersch, Biologie der Zelle, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Leipzig 1953).

Ries - Gersch schreibt: "Bei den degenerierenden Zellen kann im Kern eine Art "Entmischung" der verschiedenen Phasen erfolgen, was aus dem Auftreten von Vakuolen einerseits, durch Vergrößerung der Chromatinstrukturen andererseits zu erschließen ist. Vor allem treten dabei an der Kernwand oft gröbere, besonders stark färbbare Chromatinbrocken auf (sog. Kernwandhyperchromatose). Vielfach wird der Kern insgesamt kleiner, kompakter und homogener. Er verfällt der sog. Kernpyknose oder Kernverklumpung, die schließlich zu einer mikroskopisch homogenen Chromatinkugel führen kann"
"Sehr oft zerfällt der pyknotisch werdende Kern in einzelne, verschieden große, stark färbbare und vielfach homogen erscheinende Fragmente, die sich als Chromatinkügelchen im Plasma verteilen können, meist aber vor ihrer Auflösung im Zentrum zusammenbleiben. Dieser Zerfall wird als Karyorrhexis bezeichnet. Das Ende dieser degenerativen Entwicklung ist fast stets die Chromatolyse, d.h. die Auflösung des Chromatins in der Zelle"
In anderen Fällen kann die Chromatolyse bei noch völlig intaktem Kernbau einsetzen. In den Präparaten erkennt man dies an der zunehmenden Unfärbbarkeit der Kernstrukturen, die zuletzt nur noch schattenhaft und undeutlich angedeutet erscheinen. Der Vorgang wird als Karyolyse, als Kernauflösung, bezeichnet.

Den ersten Veränderungen des Kernes folgen schnell diejenigen des Plasmas mit der Bildung feiner Granula bis die Zelle von ihnen erfüllt ist. Schließlich löst sich die Zelle auf und zerfällt in Granula und Zelltrümmer. Diese nekrobiotischen Veränderungen sind eine Folge von Nährstoffmangel unter Einwirkung der Stoffwechselprodukte der Fibroblasten, die auf das Gewebe autotoxisch wirken (45).

Dieser Degenerationsvorgang beginnt bei Fibroblastenkulturen (Deckglaskultur) mit optimalem Medium durchschnittlich nach ca. 48 Stunden und findet nach weiteren 48 - 72 Stunden seinen Abschluss in der Nekrose des Gewebes. Züchtet man dagegen in Carrelflaschen oder in Membranflaschen, Bandier u. Bayerle (l.c.43), so kann man das Gewebe viel länger als 48 Stunden unbeeinflusst lassen, ohne daß die oben beschriebenen degenerativen Veränderungen auftreten, weil außer einer größeren Menge Nährmedium eine über die feste Mediumphase geschichtete flüssige Phase die Stoffwechselschlacken aufnimmt und verdünnt. Diese allgemein bekannten Tatsachen sollen deshalb besonders hervorgehoben werden, weil ich die Versuche mit symbiotischen Hefen im hängenden Tropfen auf dem Deckglas durchführte und zwar über die Zeit von 48 Stunden hinaus, mit dem Ziel zu erfahren, ob die Symbionten die Degenerationsvorgänge aufzuhalten oder zu verzögern imstande sind.

Versuchsanordnung:

Zum Versuch wurden die Ausgangskulturen in zwei gleichgroße Stücke geschnitten. Das eine dieser sogenannten "Schwesterstücke" wurde als Kontrolle in das, für die Versuchsreihe gewählte Kulturgefäß gegeben und unbeeinflusst durch die Keime gezüchtet. Das andere wurde dann für den Versuch verwendet d. h. es wurde zunächst wie die Kontrolle angesetzt und dann sofort, oder nach mehr oder weniger längerer Zeit, d.h. nachdem das Wachstum eingesetzt hat, mit den Keimen beimpft. Die Beimpfung erfolgte mit einer Aufschwemmung der Keime in Embryonalextrakt oder Tyrodelösung (s.u.), die bei Carrelflaschen analog der Kontrolle als flüssige Phase überschichtet oder bei der Membranflasche unter die Membran gegeben wurde. Bei Deckglaskulturen verfuhr ich entweder so, daß ich die Keime dem zum Ansetzen der Kultur dienenden Embryonalextrakt zufügte, oder daß ich zunächst die Kultur in einem kleinen Tropfen des Mediums ansetzte und nach dem Gerinnen desselben erst mit der Plasma + Mikroorganismenaufschwemmung in Embryonalextrakt überschichtete. (Die Zugabe der Mikroorganismen nur in flüssiger Phase erwies sich als ungeeignet). Die Konzentration der Mikroorganismenaufschwemmung versuchte ich in allen Fällen gleich zu halten: und zwar eine Platinöse Mikroorganismen auf 5 ccm 10 %^{igen} Embryonalextrakt (mit Ausnahme der Deckglaskulturen, bei welchen 30 %iger Embryonalextrakt verwendet wurde), in besonderen Fällen wurde der Embryonalextrakt durch Tyrodelösung ersetzt. Den Zeitpunkt der Zugabe der Bakterienaufschwemmung zur Kultur variierte ich aus folgenden Gründen: Bei sofortigem Zusatz derselben konnte ich feststellen, ob die Keime wachstumshemmend oder fördernd wirken. Den Zusatz der Bakterien zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. nach 48 Stunden), also nach Abschluß der Wachstumsperiode, wählte ich: wenn

- 1.) die Gewebekulturen bei sofortigem Zusatz kein oder nur ganz spärliches Wachstum zeigten oder ganz eingingen,
- 2.) wenn die, durch die Keime hervorgerufenen Veränderungen an der vollentwickelten Zelle studiert werden sollten.

Die Dauer der Versuche wurde nach Bedarf variiert.

Während des Versuches wurde das Wachstumsareal, sowohl des Kontroll- als auch des Versuchsgewebes alle 24 Stunden mit dem Edinger'schen Zeichenapparat gezeichnet, die resultierenden Flächen planimetrisch gemessen und auf Millimeterpapier graphisch in Form von Wachstumskurven dargestellt. Die Versuchsanordnungen wurden bei den verschiedenen Versuchsreihen nach Möglichkeit gleichgehalten, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Zur Nomenklatur ist noch zu bemerken, daß das frisch angesetzte Gewebestück, "Mutterstück" und der aus ihm hervorsprossende Schleier neuer Zellen "Wachstumshof" genannt wird.

Verarbeitung der Gewebe zur histologischen Untersuchung (49).

Da es für die histologischen Untersuchungen hauptsächlich auf den Wachstumshof der Kultur ankam, beschränkte ich mich auf die Herstellung von Totalpräparaten. Zur Fixierung verwendete ich vor allem die Fixiergemische nach Carnoy, Bouin und San Felice.

Erst nach der Fixierung, die in den Kulturgefäßen selbst vorgenommen wurde, entnahm ich die Kulturen.

Kulturen im hängenden Tropfen beließ ich gleich auf dem Deckglas.

Da in den Carrelflaschen die Kulturen auf einem kleinen Stückerhen Glimmer angesetzt wurden, gestaltete sich die Entnahme des Gewebes leicht, ohne es zu zerreißen. Bei den Membranflaschen schnitt ich einfach die Kultur mit der umliegenden Membran aus. Es wurden folgende Färbungen verwendet: Methylenblau, Haematoxylin-(Meier)-Eosin, Weigert's Eisenhaematoxylin, Haemalaun (Meier) Giemsa (Romanowsky), Karbolgentianaviolett.

In einigen Ausnahmefällen stellte ich Schnittpräparate her (Einbettung über Alkohol, Methylbenzoat, Benzol in Paraffin). Die Schnittdicke betrug durchschnittlich 5μ .

Bei der histologischen Auswertung beziehe ich mich fast ausschließlich auf das Studium der Zellen des Wachstumshofes.

Experimenteller Teil und Diskussion der Ergebnisse :

Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums durch :

A. Escherichia paracoli .

Escherichia paracoli (50-55) ist ein gramnegatives, sporenloses Stäbchen von ca. $0,5\mu$ Dick: und $1-4\mu$ Länge. Es kommt in der geißeltragenden beweglichen H-Form und in der geißellosen unbeweglichen O-Form vor, gleich den anderen, ebenfalls zur Typhus-Coli-Gruppe gehörigen Bakterien. Biochemische Eigenschaften: Milchzucker wird nicht zersetzt, in Lackmusmolke wird Alkali gebildet. Traubenzucker wird unter Gasbildung zersetzt, Neutralrot reduziert und Indol gebildet. Es findet keine Eiweißzersetzung statt, Paracoli verflüssigt Gelatine und Löfflerserum nicht, Säure wird nicht gebildet. Auf der Endoplatte wächst Paracoli in farblosen Kolonien.

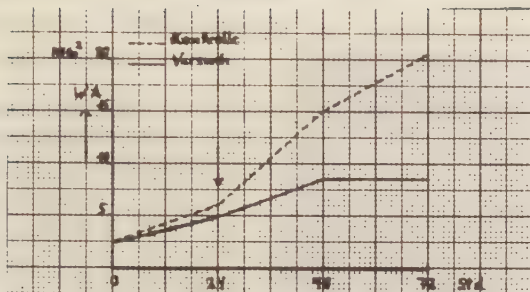
Versuch a :

Versuchsanordnung:

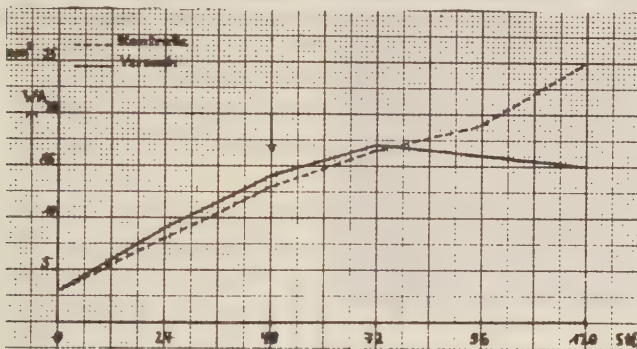
Kulturgefäß: Carrelflasche, Kulturmedium: optimal Inokulation der Bakterienaufschwemmung in Embryonal-extrakt bei Ansatz 1); gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz; bei Ansatz 2): 24 Stunden und 3): 48 Stunden später. Inkubation: bei 1) und 2): 48 Stunden, bei 3) 24, 48, 72 und 120 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die frisch angesetzten Gewebestücke (1) zeigten kein Wachstum. Setzte man die Bakterienkulturen erst 24 Stunden nach dem Fibroblastenkulturansatz zu (2), so fand man gegenüber den Kontrolle eine deutliche Wachstumshemmung (ca. 50 %) (Kurve 1). Wählte man den Inokulationszeitpunkt weitere 24 Stunden später (3) als bei Versuchsansatz 2), dann konnte erst nach 24 Stunden ein schädigender Einfluß im Sinne einer Abnahme des Wachstumsareals bemerkt werden (Kurve 2).



Kurve 1 +



Kurve 2

Histologischer Befund :

E. paracoli wächst in typischen Kolonien gut und gleichmäßig verteilt besonders auf der Oberfläche und in den oberen Schichten des Mediums.

Bei Versuchsansatz 1) wuchs keine der 5 Kulturen aus. Wurden die Fibroblastenkulturen erst 24 Stunden nach dem Ansatz (2) mit einer um das doppelte verdünnten Bakterienaufschwemmung infiziert, so zeigen sich neben normalen Fibroblasten große Komplexe, die zweifellos durch Zellfusion entstanden sind. An der Zahl der Kerne läßt sich unschwer die Zahl der in diese Komplexe eingegangenen Zellen ersehen (Abb.7). Mit fortschreitender Degeneration schließen sich mehrere derartige "Syncytien" zusammen und zeigen durch ihre körnige Beschaffenheit noch weiter fortgeschrittene Stadien des Zerfalls an. Ähnliche Beobachtungen machte M.v. M ö l l e n - d o r f f 1931 (54) an Fibrocyten von Kaninchen, die mit

Der Pfeil bedeutet Bakterienzusatz.

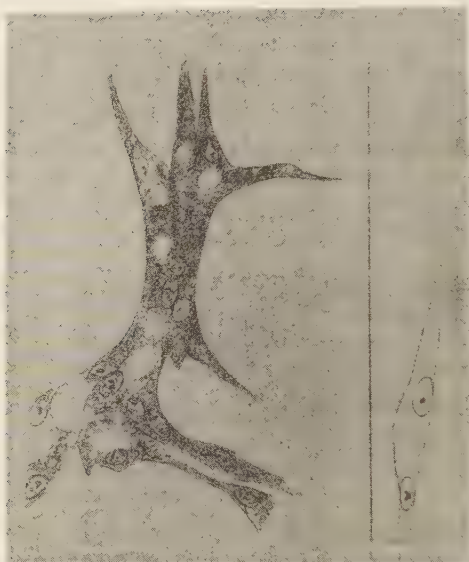


Abb. 7 : Zellfusionen bei einer mit Eparacoli infizierten Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 2). Rechts davon zum Vergleich die schematische Darstellung einer normalen Fibroblastenzelle. (340-fache Vergrößerung)

Trypanblau behandelt waren. Auch Tannenbergs beschreibt im Zusammenhang mit den Zelldegenerationserscheinungen, dass die Fibroblasten kürzer, dicker und plumper werden, ihre Ausläufer sich zu dicken Protoplasmabalken verbreitern und mit solchen anderer Fibroblasten verschmelzen.

Die Kulturen der Versuchsansätze 2) und 3) (bei 3) besonders die 48- und 72-stündig beeinflussten), die mit der üblichen Bakterienaufschwemmung beimpft wurden, zeigen dagegen hochgradige Schädigungen: sie bestehen nur noch aus abgerundeten Zellen und Übergängen zu solchen mit verwischten Zellgrenzen. Das Cytoplasma ist körnig und macht den Eindruck, als würde es von den Rändern her zum Kern hin fortschreitend aufgelöst. Es bildet zum Teil nur noch einen ganz dünnen Saum um die in Zerfall befindlichen Kerne. Teilweise ist es sogar ganz weggelöst und die Kernrückstände liegen dann nackt im Medium. An Stellen, an welchen die Zellfragmente sehr dicht liegen,

entstehen, wie zuvor beschrieben, ineinandergeflossene körnige diffus angefärbte Massen (siehe Abb. 10 ganz links). 120 Stunden beeinflusste Kulturen des Versuchsansatzes 3) sind noch stärker degeneriert.

Bei all diesen Versuchskulturen fallen in den oberen Schichten der Kultur und des Kulturmediums (+), ausser den typischen runden Paracolikolonien im Bereich des Kulturareals, spindelig angeordnete Bakterienkolonien in Form und GröÙe der Fibroblasten auf (Abb. 8 und 9). Zweifellos handelt es sich um Fibroblasten, deren Plasma restlos mit Bakterien angefüllt ist. Es kann dabei nicht festgestellt werden, ob der Kern bereits in Auflösung begriffen, resp. verschwunden ist, oder ob er lediglich von den Bakterienleibern verdeckt wird. Auf Schnittpräparaten können in einigen Fällen noch Kernfragmente gesehen werden. - Ähnliche Beobachtungen machte T a n n e n b e r g (l.c. 12).

Es ist nicht ganz leicht, zu entscheiden, ob es sich um ein aktives Einwandern der Bakterien in die Fibroblasten handelt, oder ob dieselben durch Phagocytose aufgenommen werden. Nach Tannenbergs sollen typische Fibroblasten unter normalen Bedingungen niemals phagocytieren. - Ich glaube, auf Grund meiner eigenen Untersuchungen eine aktive Einwanderung der Bakterien annehmen zu dürfen.

(+)

Wie eingangs schon erwähnt, wurde die Keimaufschwemmung zusammen mit der flüssigen Phase nach dem üblichen Ansetzen der Kultur über das geronnene Kulturmedium geschichtet. Daraus erklärt sich, daß die Keime a u f dem Medium und in der obersten Schicht wachsen und daß somit nur die obersten Zellschichten des dreidimensionalen Fibroblastennetzes mit denselben direkt in Berührung kommen können.



Abb. 8 : Ausschnitt aus dem Wachstumshof einer mit *E. paracoli* infizierten Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 2), deren oberste Zellschicht Fibroblasten zeigt, welche mit *E. paracoli* erfüllt sind. (Die untere kaum geschädigte Schicht ist nur schwach angedeutet) (135-fach Vergrößerung)

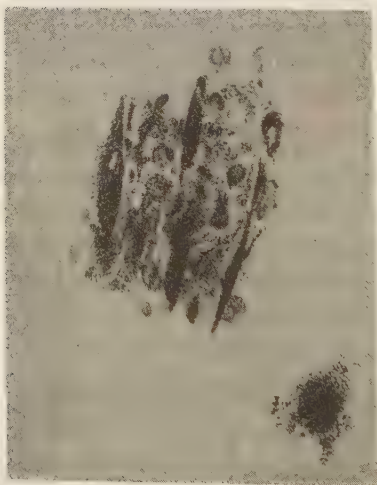


Abb. 9 : Ausschnitt aus einer durch *E. paracoli* stark geschädigten Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 2). Die oberste Zellschicht ist mit *E. paracoli* gefüllt, in den unteren Schichten sind nur noch Zellschatten zu erkennen. Rechts eine frei im Medium liegende *E. paracoli* kolonie. (340-fache Vergrößerung).

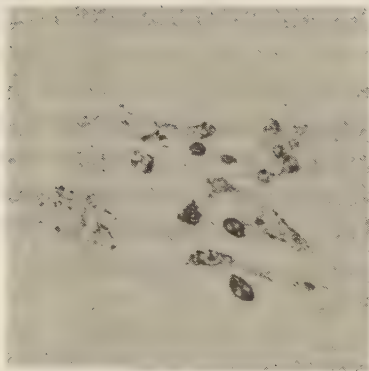


Abb. 10 : Ausschnitt aus derselben Kultur wie bei Abb. 9, (aber die obere mit Bakterien gefüllte Zellschicht fortgelassen).

Links zusammengefloßene Plasmamassen. Erklärung im Text. (340-fache Vergrößerung).



Abb. 11 : Schematische Darstellung von Zellen aus den Kontrollkulturen zu Abb. 9 und 10.

(340-fache Vergrößerung).

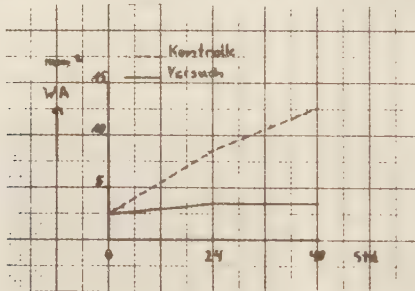
Versuch b :

Versuchsanordnung:

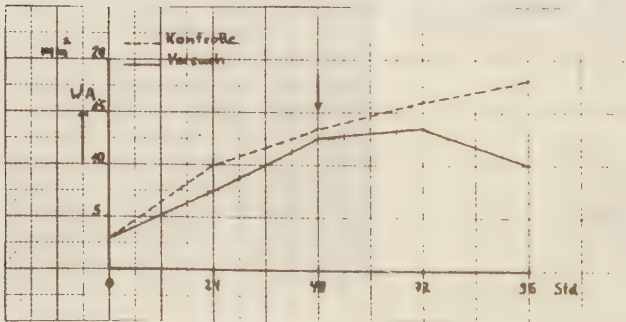
Kulturgefäß : Membranflasche; Kulturmedium: über und unter der Membran optimal. Inokulation der Bakterien-
aufschwemmung in Embryonalextrakt bei Ansatz 4); gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 5);
48 Stunden später. Inkubation: 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung:

Eine besonders deutliche Wachstumshemmung zeigte sich an frisch angesetzten Gewebekulturen (83 %) (Kurve 3), während bei Versuchsansatz 5) in den ersten 24 Stunden nur eine 20 %ige Hemmung, dann aber eine Verringerung des Wachstumsareals um 35 % in Bezug auf das vorher erreichte Areal zu beobachten war. (Kurve 4).



Kurve 3



Kurve 4

Histologischer Befund :

Bei Versuchsanordnung 4) besteht der sehr schmale Wachstumshof aus sehr weit voneinander entfernten Strängen dicht zusammenliegender und stark kontrahierter Fibroblasten und abgerundeter

Zellen. Die Kontraktion mag dadurch zustande gekommen sein, daß die Spannungsverhältnisse im Medium nachließen. So könnten vielleicht die vielkernigen Plasmamassen erklärt werden, die nicht größer als normale Fibroblasten sind. Die Kerne solcher Zellverbände zeigen zwar ein normales Bild, doch sind sie nur $1/4$ bis $1/6$ so groß wie die der Kontrollen (Abb. 12 und 13). Die Kulturen der Versuchsanordnung 5) lassen dagegen eine stärkere Schädigung erkennen, indem sich ihr histologisches Bild weitgehend mit dem der stark befallenen Fibroblastenkulturen des Versuchsansatzes 2) und 3) deckt (mit Ausnahme, daß natürlich die mit Bakterien gefüllten Zellen fehlen).



Abb. 12 : Zusammengelagerte und kontrahierte Zellen einer durch *E. paracoli* beeinflussten Membranflaschenkultur mit vielen Kernen.
(Versuchsansatz 4).
(340-fache Vergrößerung).



Abb. 13 : Schematische Darstellung von Zellen aus der Kontrollkultur zu Abb. 12.
(340-fache Vergrößerung).

Versuch c :

Versuchsordnung:

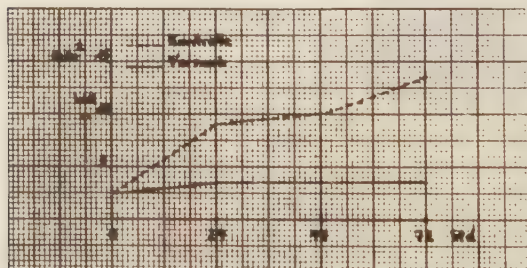
Kulturgefäß: Membranflasche. Kulturmedium: über der Membran optimal, unter der Membran Tyrodelösung. Inokulation der Bakterienaufschwemmung in Tyrodelösung bei Ansatz 6): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 7): 48 Stunden später, Inkubation 72 Stunden.

Makroskopische Beobachtung:

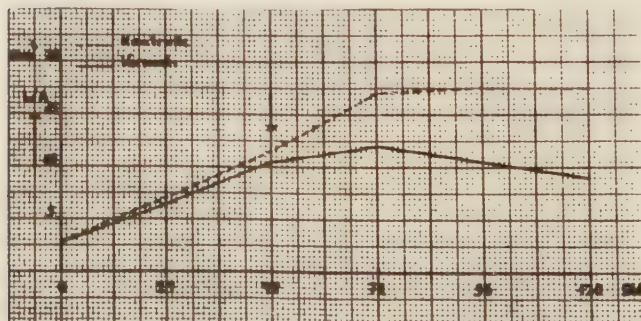
Wieder wurden sofort beimpfte Fibroblastenkulturen stark gehemmt (85 %) (Kurve 5), während 48 Stunden nach dem Ansatz beimpfte zwar in den ersten 24 Stunden noch etwas wuchsen, dann aber ihr Areal verringerten (33 %) (Kurve 6).

Histologischer Befund.

Alle Kulturen des Versuches c) sind noch stärker degeneriert als die des Versuchsansatzes 3) (d.h. 48- und 72-stündig durch E. paracoli beeinflusste Carrelflaschenkulturen).



Kurve 5



Kurve 6

Diskussion der Ergebnisse :

Die Versuchsansätze 1, 4 und 6 lassen folgende Schlüsse und Überlegungen zu: Eine direkte Inkubation der Fibroblasten mit *Escherichia paracoli* hemmte das Wachstum der Fibroblasten vollständig. Diese Hemmung muß wohl auf Stoffwechselprodukte der Keime zurückgeführt werden, welche in dem Maße als sie entstehen, oder schon in den Bakterienkulturen vorhanden waren, die Fibroblastenkulturen schädigen.

Daß diese Erklärung zulässig ist, erhellt aus den Membranflaschenversuchen. Hier findet man einen deutlichen Wachstumshof von kleinen weitmaschig gelagerten Fibroblasten, an denen sich aber überall Schädigungen in Form von Plasmaauflösung und Zusammenlagerung von Zellen zeigen. Offensichtlich sind in diesem Falle (bei Zwischenschalten einer Membran) die Hemmstoffe langsamer in das Medium diffundiert. ----- Bei einem etwas abgeänderten Versuch (6) wurden die Bakterienkeime nicht zusammen mit dem Embryonalextrakt in den unteren Kulturraum gebracht, sondern in Tyrodelösung; während der ersten 48 Stunden sah man die Fibroblastenkultur zu einem Wachstumshof eng aneinanderliegender Zellen anwachsen. Da die makroskopische Beobachtung mit dem letztgenannten Versuch übereinstimmte, ließ ich die Kulturen noch weitere 24 Stunden bebrüten, was zur Folge hatte, daß die Kulturen völlig der Degeneration anheimfielen. Wahrscheinlich spielten dabei der toxische Einfluß, als auch der etwas später einsetzende Nahrungsentzug aus dem Fibroblastenkulturmedium durch die Keime eine Rolle.

Gab man die Paracoliaufschwemmung dagegen erst 48 Stunden (bezw. 24 Stunden) nach dem Fibroblastenkulturansatz zu, so zeigten die Carrelflaschenkulturen größtenteils starke nekrobiotische Veränderungen. Nur bei einer, 24 Stunden nach dem Ansatz beimpften Kultur, gehen die Degenerationerscheinungen noch nicht so weit. Auch sie zeigt, wie die sofort beimpften Kulturen, Zellenzusammenlagerungen und mit Bakterien gefüllte Fibroblasten. --- Bei den Membranflaschenkulturen (mit Extrakt unter der Membran) ist die Schädigung geringer. Die Membranflaschenkulturen (mit Tyrodelösung unter der Membran) stehen

in ihrem Schädigungsgrad zwischen dem Carrelflaschenversuch und dem letztgenannten.

In der nachfolgenden Tabelle sei die Wachstumshemmung übersichtlich dargestellt.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch Escherichia paracoli
Am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen)

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz:	Versuchszeiten:		
			24 Std.	48 Std.	72 Std.
-	1	Carrelflasche; Bak- terieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	100 %	100 %	--
1	2	Carrelflasche; Bak- terieninokulation 24 Stunden nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	50 %	kein weiteres Wachstum mehr	--
2	3	Carrelflasche; Bak- terieninokulation 48 Stunden nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	0 %	das Wachstumsareal v ringerte sich um 11	
3	4	Membranflasche; über und unter der Membran optimales Medium; Bak- terieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	83 %	kein weiteres Wachstum mehr	--
4	5	Membranflasche; über und unter der Membran optimales Medium; Bak- terieninokulation 48 Stunden nach dem Fibro- blastenkulturansatz.	20 %	das Wachstums- areal verrin- gerte sich um 35 %	--
5	6	Membranflasche; über der Membran optimales Medium, unter der Mem- bran Tyrodelösung. Bak- terieninokulation gleich- zeitig mit dem Fibro- blastenkulturansatz.	85 %	kein weiteres Wach- tum mehr	
6	7	Membranflasche; über der Membran opt. Medium unter der Membran Ty- rodelösung; Bakterien- inokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	38 %	das Wachstumsareal verringerte sich um 33 %	

B. Pseudomonas pyocyaneum.

Die Mitbeteiligung dieses Bakterienstammes bei infektiösen pathologischen Prozessen (Eiterungen, Gewebeeinschmelzungen usw.) ließen sie mir für meine Fragestellung besonders geeignet erscheinen.

P. pyocyaneum (l.c. 50, 55, 56) ist ein schlankes, bewegliches, gramnegatives Stäbchen. *Pyocyaneum* wächst gut auf den gebräuchlichen Nährböden; auf Agar in Form runder Kolonien; auf Plattennährböden rasenbildend; auf Gelatine, die verflüssigt wird, unregelmäßig begrenzt; Bouillon wird getrübt; Milch koaguliert und peptonisiert. Charakteristisch ist die Bildung eines blaugrünen Farbstoffes (Pyocyanin).

Die Keime kommen in der Natur weit verbreitet vor. Man findet *Pyocyaneum* als Mischinfektion bei Tuberkulose (blaugrüner Auswurf), und ebenfalls zusammen mit anderen Bakterien bei Entzündungen der Blase. Selten ist er, besonders bei geschwächten Individuen, allein krankheitserregend.

Versuch d :

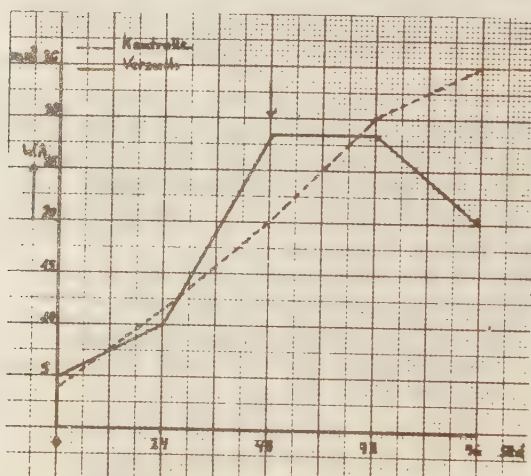
Versuchsanordnung:

Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium: optimal; Inokulation der Bakterienaufschwemmung in Embryonal-extrakt bei Versuchsansatz 8): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 9): 48 Stunden später und bei Ansatz 10): ebenfalls 48 Stunden später, aber die Bakterienaufschwemmung wurde zur Hälfte mit Embryonalextrakt verdünnt. Inkubation bei Ansatz 8) und 9): 48 Stunden, bei Ansatz 10): 24 Stunden.

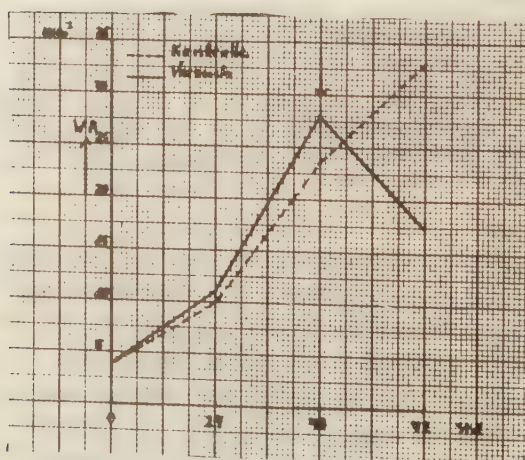
Makroskopische Beobachtung:

Erfolgte die Beimpfung gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz (8), dann zeigte sich keinerlei Wachstum : während der ersten 24 Stunden begannen sich das Kulturmedium und die Kulturen aufzulösen. Genauso verhielten sich die Kulturen des Ansatzes 9). (Kurve 7). Schließlich waren in dem völlig verflüssigten Medium nur noch undeutliche Zelltrümmer zu sehen. Der Versuchsansatz 10) wurde in der Absicht frühzeitig abgebrochen, um die ersten Veränderungen durch den Bakterieneinfluss

genau erfassen zu können (Kurve 8).



Kurve 7



Kurve 8

Histologischer Befund :

Pyocyaneum wächst rasenbildend über Kultur und Medium gleichmäßig verteilt. Bei Versuchsanordnung 9) liegen in Auflösung begriffene Kulturen vor. Die Zellen sind nur noch als kernlose "Schatten" zu erkennen. Einige dieser stark geschädigten Zellen enthalten einige Bakterien. Auch wenn ich die Bakteriënaufschwemmung um die Hälfte reduzierte (10) und die Inkubationsdauer auf 24 Stunden beschränkte, begannen sich das Medium und die Kulturen aufzulösen: die Zellen sind unter Abkugelung auseinander gerückt. Ihre Größe beträgt nur noch $1/3$ bis $1/7$ der Zellgröße der Kontrolle (Abb. 14). Die Kerne sind pyknotisch oder in Auflösung begriffen. Die Schrumpfung und Abkugelung kann einmal eine Reaktion der Zellen auf das sich verflüssigende Medium sein, denn Abkugelung der Zellen ist eine in der Gewebezüchtung bekannte Anpassungserscheinung an flüssiges Medium. Zum anderen könnte vielleicht die Schrumpfung auf Energieverlust der Zelle beruhen.

b. 14 : ⁺ geschrumpfte
llen einer mit Pyo-
aneum infizierten Car-
lflaschenkultur (Ver-
chsansatz 10)
chts: Zellen der dazu-
hörigen Kontrolle
(40-fache Vergrößerung)
links:

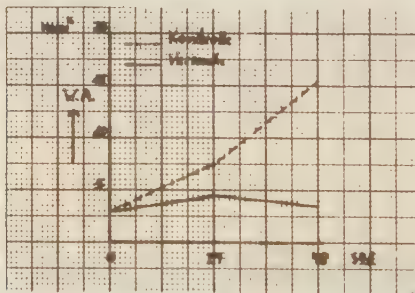
Versuch e :

Versuchsanordnung:

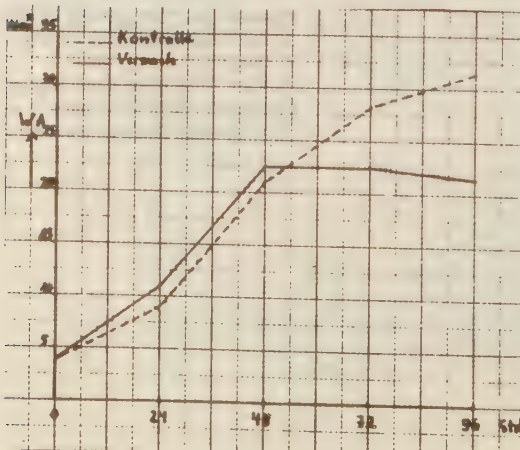
Kulturgefäß: Membranflasche; Kulturmedium: über und unter der Membran optimal. Inokulation der Bakterien-aufschwemmung in Embryonalextrakt bei Ansatz 11): gleich zeitig mit dem Fibroblastenkulturenansatz, bei Ansatz 12): 48 Stunden später. Inkubation 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Sofort infizierte Kulturen wuchsen in den ersten 24 Stunden nur ganz wenig aus, dann verringerte sich das Areal wieder (Kur-ve 9). Bei Versuchsanordnung 12) behielten die Kulturen 24 Stunden lang ihre Größe, dann verringerten sie sich jedoch um 5 % (Kurve 10). In keinem Fall wurden weder Kultur noch Medium aufgelöst.



Kurve 9



Kurve 10

Histologischer Befund:

Alle Kulturen des Versuches e) zeigen hauptsächlich Hungerfibroblasten mit pyknotischen Kernen. Die Zellgröße läßt Übereinstimmung mit der der Kontrollen erkennen.

Diskussion der Ergebnisse :

Mit *Pseudomonas pyocyaneum* angesetzte Fibroblastenkulturen starben bei direkter Berührung mit den Bakterienkeimen unter Auflösungserscheinungen ab. Bei Zwischenschaltung einer Cellophanmembran zwischen Fibroblasten und Bakterien wurde das Wachstum stark gehemmt; eine Auflösung der Kultur und des Mediums fand aber nicht statt. Man darf annehmen, daß hochmolekulare Fermente in diesen Fällen die Membran nicht durchdringen, wohl aber kleinmolekulare wachstumshemmende Stoffe.

Wir können also unterscheiden zwischen einer unmittelbaren Schädigung durch proteolytische Fermente und einer langsam wirkenden Wachstumshemmung.

Dies wird auch erhärtet durch die anderen Versuche dieser Reihe, bei welchen eine Keimaufschwemmung zugesetzt nach erst 48 Stunden, Fibroblastenkultur und Medium zur Auflösung brachte, während eine Verdünnung der gleichen Keimaufschwemmung nur das Medium teilweise verflüssigte, nicht aber die Kulturen selbst angriff. Bei dem Membranflaschenversuch waren die Medien nicht verflüssigt und die Kulturen nicht abgetötet, aus Gründen, die oben in Erwägung gezogen sind.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch Pseudomonas pyocyaneum (am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen)

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten:	
			24 Std.	48 Std.
-	8	Carrelflasche. Bakterieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz.	100 %	die Kulturen lösten sich auf
7	9	Carrelflasche. Bakterieninokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkulturansatz.	100 %	die Kulturen lösten sich auf
8	10	Carrelflasche. Bakterieninokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkulturanatz (Pyocyaneum-aufschwemmung auf die Hälfte reduziert).	Das Wachstumsareal verringerte sich um 33 %	----
9	11	Membranflasche. Über und unter der Membran optimales Medium. Bakterieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturanatz.	70 %	Das Wachstumsareal verringerte sich um 66 %
10	12	Membranflasche. Über und unter der Membran optimales Medium, Bakterieninokulation 48 Stunden nach dem Fibroblastenkulturanatz.	100 %	Das Wachstumsareal verringerte sich um 5 %

C. Bacterium faecalis alcaligenes:

B. faecalis alcaligenes (l.c. 53) ist ein gram-negatives sporenloses Stäbchen, das nicht zu den Colibakterien im engeren Sinne gehört. Es sind schlanke Stäbchen mit lebhafter Bewegung und kurze Stäbchen ohne Bewegung zu unterscheiden, außerdem Übergangsformen.

Faecalis zeigt gutes Wachstum auf allen gebräuchlichen Nährböden.

Die biochemischen Eigenschaften von Faecalis:

Milch wird nicht zur Gerinnung gebracht. Auf

Blutnährböden findet keine Haemolyse statt.

Sie sind weder Säure- noch Gasbildner.

Faecalis sind normale, aber selten vorkommende Darmbakterien.

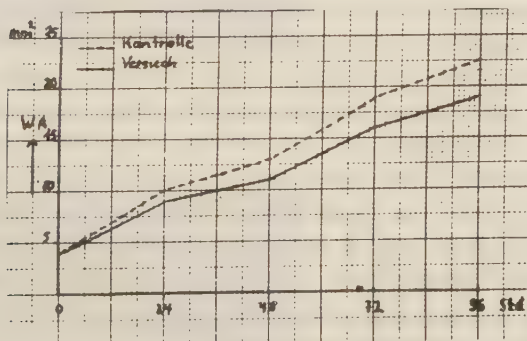
Versuch f :

Versuchsanordnung:

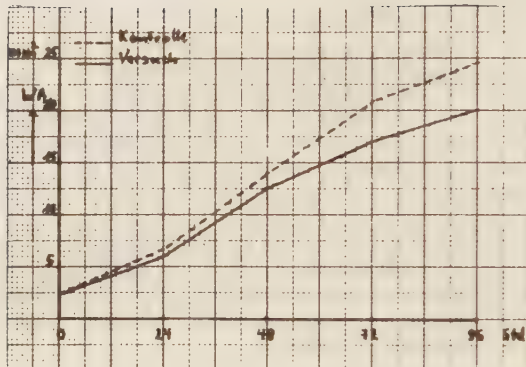
Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium: optimal Inokulation der Keimaufschwemmung in Embryonal-extrakt bei Ansatz 13): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 14) und 15): 48 Stunden später. 15) wurde jedoch mit einer 4-fach stärkeren Bakterienaufschwemmung infiziert. Inkubation bei Ansatz 13) und 14): 48 und 96 Std., bei Ansatz 15): 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Alle Kulturen des Versuches f) wurden um durchschnittlich 20 % im Wachstum gehemmt (Kurve 11 und 12).



Kurve 11
(Versuchsansatz 13)



Kurve 12
(Versuchsa-
satz 14)

Histologischer Befund :

Die Bakterien sind gleichmäßig über Kultur und Medium verteilt. Die 48 Stunden unter Bakterieneinfluß gestandenen Kulturen der Ansätze 13) und 14) zeigen nur geringe Schädigungen: nämlich hin und wieder Zellzusammenlagerungen und dadurch Entstehung vielkerniger Verbände (Abb. 15), sowie einige bakteriengefüllte Fibroblasten in den obersten Schichten des dreidimensionalen Fibroblastennetzes. Je nach dem Grad des Befalles zeigen die Zellen normale Kerne, Karyorrhexis oder Pyknose (Abb. 16). Auch hier nehme ich ein aktives Eindringen der Bakterien aus denselben Gründen wie bei dem Paracoliversuch an. Im übrigen gleicht die Hauptmasse der Zellen jenen der Kontrollen.

Nach weiterem 48 Stunden Versuchsdauer ist der bereits eingeleitete nekrobiotische Vorgang weiter fortgeschritten: Zellen sind unter Einziehung ihrer Ausläufer auseinander rückt und ihre Kerne zeigen alle Übergänge vom normalen Aussehen bis zur Lysis (Abb. 17 und 18). Die Zellgrenzen sind z.T. verwischt. Zellzusammenlagerungen und bakteriengefüllte Zellen trifft man häufiger an (Abb. 19). Versuchsanlage 15), der mit der 4-fach stärkeren Bakterienaufschwemmung infiziert war, zeigt diese eben beschriebenen Veränderungen schon nach 48-stündiger Versuchsdauer. Besonders gehäuft hier die Zellzusammenlagerungen.

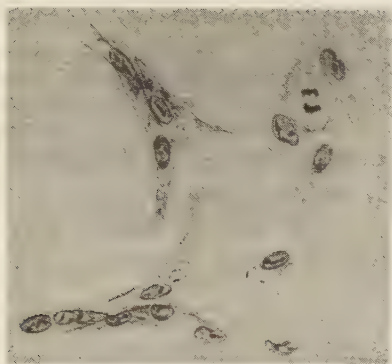


Abb. 15 : Zellzusammenlagerungen in einer 48 Stunden durch Faecalis beeinflussten Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 13).
(340-fache Vergrößerung)



Abb. 16 : Schnittpräparat einer Carrelflaschenkultur mit Faecaliseinschlüssen in den Zellen (Versuchsansatz 13).
(340-fache Vergrößerung)

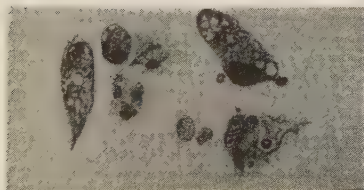


Abb. 17 : Stark degenerierte Zellen einer 96 Stunden unter Faecaliseinflus gestandenen Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 13).
(340-fache Vergrößerung)

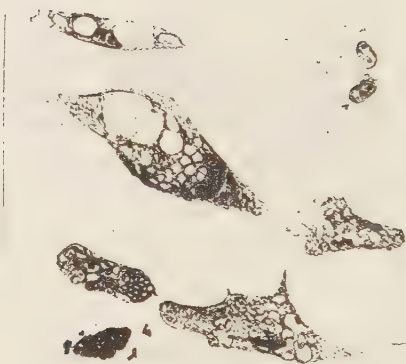


Abb. 18 : Stark degenerierte Fibroblasten einer 96 Stunden unter Faecaliseinfluß gestandenen Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 14). Links unten eine bakteriengefüllte Zelle. (340-fache Vergrößerung)

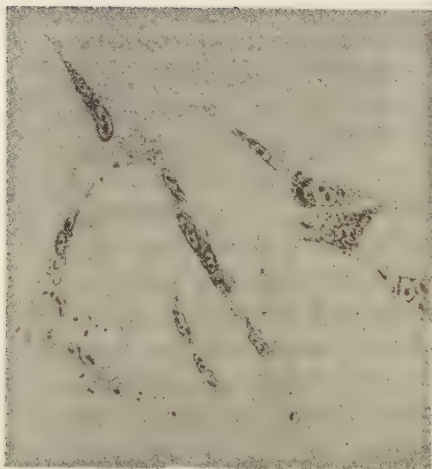


Abb. 19 : Zusammengelagerte und z. T. mit Bakterien gefüllte Fibroblasten einer Carrelflaschenkultur (Versuchsansatz 14) . (340-fache Vergrößerung)

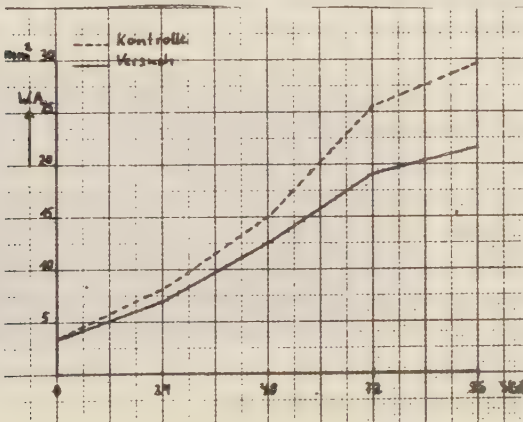
Versuch g :

Versuchsanordnung:

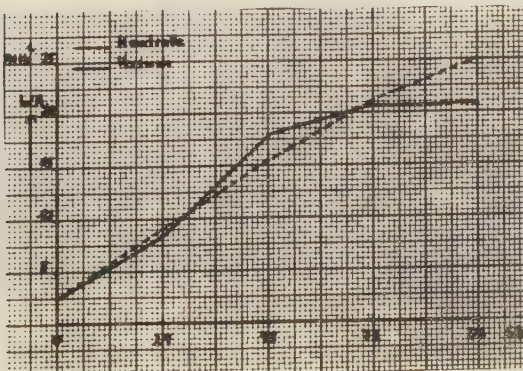
Kulturgefäß: Membranflasche. Kulturmedium: über und unter der Membran optimal. Inokulation der Bakterienaufschwemmung in Embryonalextrakt bei Ansatz 16): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 17): 48 Stunden später. Inkubation bei Ansatz 16): 48 und 96 Stunden, bei Ansatz 17): 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Das Wachstum der Kulturen des Ansatzes 16) wurde um 20 bis 30 % gehemmt (Kurve 13), bei Ansatz 17) trat erst nach 24 Stunden Inkubation Wachstumsstillstand ein (Kurve 14).



Kurve 13



Kurve 14

Histologischer Befund :

Gleichzeitig mit dem Ansatz infizierte Fibroblastenkulturen (16) zeigen nach 48 Stunden ein normales Bild. Während weiterer 48 Stunden jedoch zerfällt der Wachstumshof in nahezu zusammenhanglose, kleine stark geschrumpfte Fibroblasten, abgekugelte Zellen und Übergangsformen zwischen beiden. Die Zellgröße beträgt etwa nur $1/7$ bis $1/10$ der Norm. Auch hier dürften dieselben Gründe maßgeblich sein, wie bei Versuch d) diskutiert wurde. Die Kerne zeigen Hyperchromatose und Pyknose, in seltenen Fällen Lysis; die Zellgrenzen sind meist deutlich.

48 Stunden nach dem Ansatz infizierte Gewebekulturen bestehen hauptsächlich aus normalen Fibroblasten. Daneben sind Zellen auffällig, die tropfige Anhänge tragen: Diese Zellen setzen sich aus einem zentralen Teil meist in Form und Größe einer abgekugelten Zelle mit einem Kern, der von Fall zu Fall die verschiedensten Degenerationsmerkmale zeigen kann, und einem Kranz rundlicher bis länglicher Gebilde zusammen, die z.T. durch Plasmabrücken mit dem zentralen Teil in Verbindung stehen. Sie weisen hin und wieder dichte Schollen auf, die vielleicht in genetischem Zusammenhang mit dem Kern stehen. Keine dieser anormalen Zellen weist also einen normalen Kern auf.

Karyorrhexis herrscht vor. Da der Verdacht bestand, daß es sich um zufällige Bildungen handelte, wurde der Versuch mehrfach wiederholt mit dem gleichen Ergebnis.

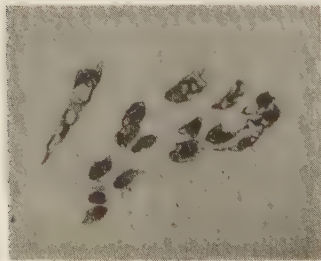


Abb. 20 : Stark kontrahier-
te und geschädigte Zellen
einer von Faecalis beein-
flußten Membranflaschen-
kultur (Ansatz 16).
(340-fache Vergrößerung)



Abb. 21 : Schematische Darstellung von Zellen aus der Kontrollkultur zu Abb. 20. Mehrkernige Fibroblasten, wie ich sie hier gezeigt habe, kommen nur sehr selten vor. (340-fache Vergrößerung)



Abb. 22 : Zellen mit Plasmausstoßungen. Rechts davon abgerundete Zellen mit zerfallenen Kernen; an einer von Faecalis beeinflussten Membranflaschenkultur (Ansatz 17). (340-fache Vergrößerung)

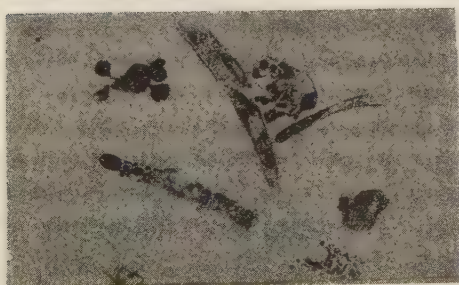


Abb. 23 : Zellen mit Plasmausstoßungen aus einer Membranflaschenkultur, welche unter dem Einfluß der Stoffwechselprodukte von B. faecalis stand (Ansatz 17) (340-fache Vergrößerung)



Abb. 24 : Schematische Darstellung von Zellen aus den Kontrollkulturen zu Abb. 22 und 23.
(340-fache Vergrößerung)

Diskussion der Ergebnisse :

Wurden die Gewebe in unmittelbarem Kontakt mit den Bakterien gebracht (Carrelflaschenversuch f), so zeigen sich schon nach relativ kurzer Versuchsdauer (48 Std.) nekrobiotische Veränderungen, die bei Fortsetzung des Versuches um weitere 48 Std. besonders ausgeprägt sind. Bei Zwischenschalten einer Cellophanmembran zwischen Fibroblastenkultur und Bakterienaufschwemmung tritt eine Schädigung erst viel später ein, ein Zeichen dafür, daß die schädigenden Stoffe nicht unmittelbar einwirken, sondern langsam durch die trennende Membran diffundieren.

Am auffälligsten an den Membranflaschenkulturen des Ansatzes 17) sind die Zellen mit Plasmaausstoßungen. Wie solche Gebilde zustande kommen, kann vorläufig noch nicht entschieden werden. Man weiß nur, daß bei Anreicherung der Atmosphäre des Züchtungsgefäßes mit Kohlendioxyd und gleichzeitigem Sauerstoffmangel solche Zustände der Fibroblasten häufiger beobachtet wurden. Jedenfalls weist der für solche Zellen charakteristische Kernzerfall, bei gleichzeitiger Ausstoßung von Kernfragmenten, auf schwerste Zellschädigungen hin.

Normalerweise werden auch in den späten Phasen der Zellteilung der Fibroblasten pseudopodienartige Fortsätze nach allen Seiten ausgesandt. Jedoch steht nicht fest, ob diese Zustände eine gewisse Ähnlichkeit mit den von mir beobachteten Zuständen der Fibroblasten besitzen und im gleichen Sinne gedeutet werden können. (Vergleiche Abb. 33 in Ries-Gersch l.c. 46).

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch *Bacterium faecalis alcaligenes*

(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen.)

Vers.- Nr.	Ansatz:	Versuchszeiten:			
		24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
13	Carrelflasche: Bakterieninoku- lation gleich- zeitig mit dem Fibroblastenkul- turansatz	16 %	20 %	20 %	20 %
14	Carrelflasche: Bakterieninoku- lation 48 Std. nach dem Fibro- blastenkultur- ansatz	20 %	20 %	---	---
15	Carrelflasche: Bakterieninoku- lation 48 Std. nach dem Fibro- blastenkultur- ansatz	20 %	20 %	28 %	28 %
16	Membranflasche: über und unter der Membran op- timales Medium. Bakterieninoku- lation gleichzei- tig mit dem Fibro- blastenkulturansatz	20 %	20 %	30 %	30 %
17	Membranflasche: über und unter der Membran optimales Medium. Bakterien- inokulation 48 Std. nach dem Fibrobla- stenkulturansatz.	0 %	0 %	---	---

D. Bacterium proteus.

B.proteus (l.c. 52, 56) ist ein dünnes, schlankes gramnegatives Stäbchen, das zu langen Fäden auswachsen kann. Es ist peritrich begeißelt und lebhaft beweglich.

B.proteus gedeiht gut auf allen gebräuchlichen Nährböden. Es bildet keine scharf abgegrenzten Kolonien, weil die Bakterien von der Mutterkolonie ausschwärmen.

B.proteus ist weit verbreitet und spielt bei Fäulnisprozessen eine Rolle, denn es besitzt starke ~~e i w e i ß z e r s e t z e n d e~~ Eigenschaften und baut Aminosäuren durch Dekarboxylierung zu Aminen ab. Traubenzucker und Saccharose werden unter Gasbildung gespalten. Milchzucker wird nicht angegriffen. Die Milch gerinnt ohne Säurebildung. Schwefelwasserstoff wird produziert. Gelegentlich wird B.proteus als alleiniger Erreger bei Entzündungen des Darmtraktes gefunden.

Versuch h :

Versuchsanordnung:

Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium : optimal Inokulation der Bakterienaufschwemmungen (Es wurden 2 Stämme : Proteus O 19 und H 19 verwendet) in Embryonalextrakt bei Anordnung 18): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 19): 48 Stunden später. Inkubation 48 Stunden.

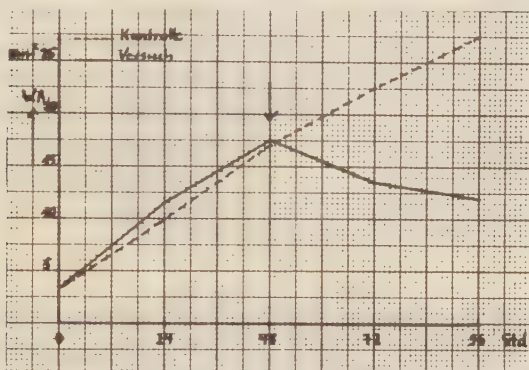
Makroskopische Beobachtung.

Proteus ist gut und gleichmäßig über Kultur und Medium verteilt. Keine der Kulturen des Ansatzes 18) wuchs aus; die Gewebestücke starben ab und lösten sich auf. Das Wachstumsareal der 48 Stunden nach Ansatz beimpften Kulturen (19) verringerte sich, bezogen auf das vor der Beimpfung erreichte Areal, um 26 bis 29 % (Kurve 15).

Histologischer Befund :

Die Kulturen des Versuchsansatzes 19) zeigen nach 24-stündiger Beeinflussung starke nekrobiotische Veränderungen: vorherrschend sind abgerundete Zellen mit verwischten Grenzen und pyknotischen Kernen. Nach weiteren 24 Stunden sind die Zellen

nur noch als Schatten erkennbar. Die Kerne zeigen lytische Veränderungen, einige sind pyknotisch.



Kurve 15.

Versuch j :

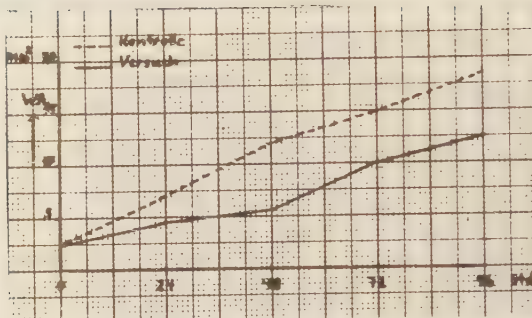
Versuchsanordnung:

Kulturgefäß: Membranflasche. Kulturmedium: über der Membran optimal, unter der Membran Tyrodelösung Inokulation der Bakterienaufschwemmung in Tyrodelösung (O 19 und H 19) bei Versuchsansatz 20): gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 21): 48 Stunden später. Inkubation bei Ansatz 20): 72, 120 und 148 Stunden, bei Ansatz 21) 48 Stunden.

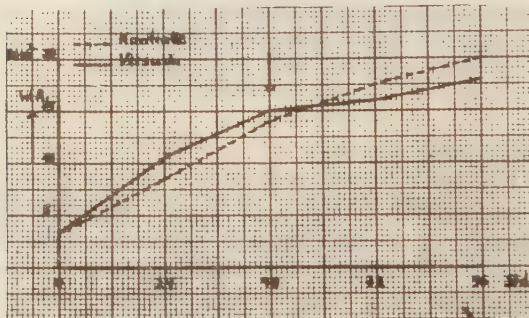
Ich wählte dieses Mal Tyrodelösung zur Bakterienaufschwemmung, weil Proteus als Fäulnisbakterium den Embryonalextrakt sofort zu zersetzen begann.

Makroskopische Beobachtung:

Die Kulturen des Ansatzes 20) wuchsen nur wenig aus (Kurve 16) und blieben am Ende des Versuches (nach 96 Stunden) gegenüber den Kontrollen um 38 % zurück. Die Kulturen des Versuchsansatzes 21) erfuhren dagegen im gleichen Zeitraum nur eine geringe Hemmung von ca. 10 % (Kurve 17).



Kurve 16



Kurve 17

Alle Kulturen des Versuches j) zeigen weitgehend das gleiche Bild: Der Wachstumshof ist in abgerundete Zellen mit größtenteils pyknotischen Kernen zerfallen; bei Ausdehnung der Bebrühtungszeit erkennt man nur noch Zellschatten mit teilweise aufgelösten Kernen.

Es zeigt sich, dass die durch *Proteus* H 19 beeinflussten Fibroblastenkulturen nicht so stark geschädigt werden, wie durch den Stamm O 19.

Diskussion der Ergebnisse :

Wenn die Fibroblastenkulturen direkt in Berührung mit *Bacterium proteus* H 19 und O 19 waren, so starben sie ab, noch ehe es zu einer Auswanderung von Zellen kommen konnte. Waren Zellen und

Keime durch eine Membran getrennt, so wuchsen die Kulturen ein wenig aus. Erst wenn *B. proteus* sich in genügendem Maße unter der Membran vermehrt und dabei dem Substrat Nahrung entzogen hatte, zeigten sich die ersten Schäden an den Fibroblasten. Dabei machen sich auch die Bakteriengifte und vor allem die Bakterienenzyme geltend, so daß es schließlich zu einer Auflösung der Zellen kommt.

Genauso verhalten sich Kulturen, die erst 48 Stunden nach Ansatz beimpft wurden.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch

Bakterium proteus

(am Areal in % gemessen, bezogen auf die Kontrollkulturen).

Nr.	Vers.	Ansatz:	Versuchszeiten:			
			24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
18		Carrelflasche. Bakterieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz	die Kulturen starben unter Auflösung ab.	--	--	--
19		Carrelflasche. Bakterieninokulation 48 Stunden nach dem Fibroblastenkulturansatz	das Wachstumsareal verringerte sich um 26 bis 29 %.	--	--	--
20		Membranflasche: über der Membran optimales Medium, unter der Membran Tyrodelösung; Bakterieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz	65 %	62 %	40 %	38 %

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz:	Versuchszeiten :			
			24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 St
17	21	Membranflasche: über der Membran optimales Medium, unter der Membran Tyrodelösung. Bak- terieninokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	10 %	12 %	---	---

E. Bacillus subtilis:

Bacillus subtilis (l.c. 51) ist ein grampositives, bewegliches, peritrich begeißeltes, sporenbildendes Stäbchen. Seine Dicke beträgt 0,8 bis 1,5 μ ; die Länge 2 bis 4 μ ; die Sporen sind 0,6 bis 1,2 μ groß.

B.subtilis (Heubacillus) ist bekannt als Ursache der Selbsterhitzung von (feuchtem) Heu. Dabei entstehen entzündliche Gase, die Selbstentzündung des Heues verschulden.

Der Bacillus ist ein normaler Fäulniserreger des Humus. Seine Zersetzungskraft äußert sich in der Verflüssigung der Nährgelatine.

Versuch k :

Versuchsanordnung:

Kulturgefäß : Carrelflasche. Kulturmedium : optimal. Inokulation der Bacillenaufschwemmung in Embryonalextrakt bei Ansatz 22) : gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 23) : 48 Stunden später.
Inkubation 24 und 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

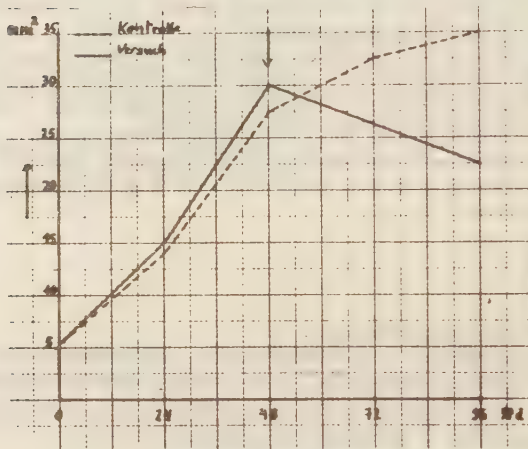
Bei allen Kulturen des Versuches k) begann der Auflösungsprozess während der ersten 24 Stunden der Beeinflussung. Er fand nach weiteren 24 Stunden (wenn der Versuch nicht unterbrochen wurde) seinen Abschluß in der völligen Lysis der Gewebe. Wie Kurve 18 (Ansatz 23) zeigt, nimmt das Areal dabei stark ab (43 %). Bei den Gewebekulturen des Ansatzes 22) wurde von Anfang an jegliches Wachstum unterdrückt.

Histologischer Befund :

B. subtilis überwuchert dicht, in langen Ketten liegend, Kultur und Medium.

48 Stunden nach Ansatz beimpfte Kulturen zeigen nur noch schwach anfärbbare Schatten stark kontrahierter Zellen. Kerne sind nicht mehr erkennbar. Die stark aufgelösten Zellen sind teil-

weise nur noch als faserige Flecken erkennbar (Abb. 25).



Kurve 18

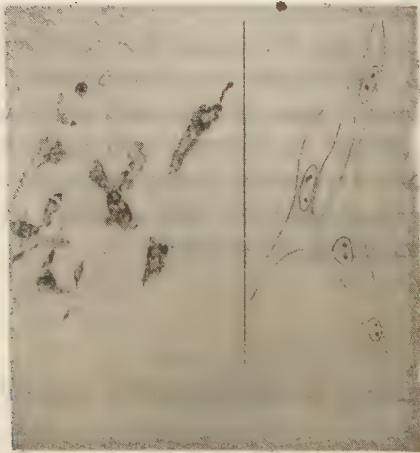


Abb. 25 : Geschrumpfte und z.T. aufgelöste Zellen einer mit *B. subtilis* infizierten Carrelflaschenkultur. Rechts schematische Darstellung von Zellen der dazugehörigen Kontrolle. (340-fache Vergrößerung)

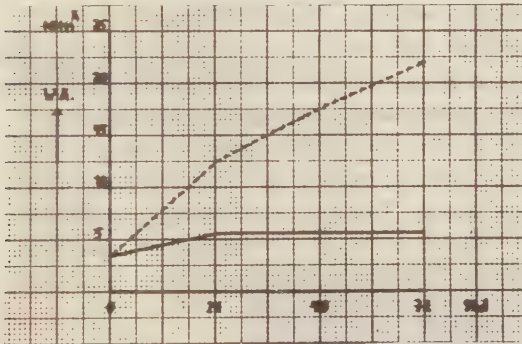
Versuch 1 :

Versuchsanordnung :

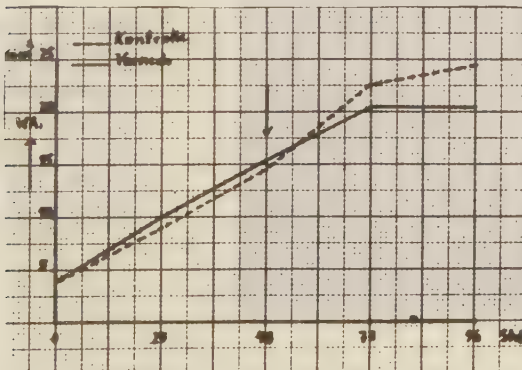
Kulturgefäß : Membranflasche. Kulturmedium : über und unter der Membran optimal. Inokulation der Bacillenaufschwemmung in Embryonalextrakt bei Ansatz 24) : gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturanatz, bei Ansatz 25) : 48 Stunden später. Inkubation 96, 144 und 168 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Sowohl die gleichzeitig mit dem Ansatz (Kurve 19), als auch die 48 Stunden später (Kurve 20) beimpften Gewebekulturen wuchsen nur wenig aus, dann sistierte das Wachstum.



Kurve 19



Kurve 20

Histologischer Befund :

Die Wachstumshöfe der Kulturen des Ansatzes 24) sind sehr weitmaschig und schmal. 4 Tage alte Kulturen bestehen hauptsächlich aus typischen Fibroblasten mit normalen Kernen. Ihr Plasma ist dichter und gekörnt und von zahlreichen Vakuolen durchsetzt. Nach 6 Tagen zeigen diese Kulturen schon deutliche Degenerationserscheinungen, die da und dort in den pyknotischen Kernen zum Ausdruck kommen.

Im Laufe dieses Versuches nehmen mit der Dauer der Beeinflussung die mehrkernigen Verbände zu. Man kann auch Übergangsstadien beobachten, wie sie bei dem Paracoli-Versuch (Versuch a)) beobachtet wurden. In Abb. 26 wird ein noch weiter fortgeschrittenes Stadium aus einer 6 Tage alten Kultur gezeigt. Nach weiteren 4 Tagen starben diese Kulturen.

Gewebekulturen, welche 48 Stunden nach Ansatz (25) beimpft wurden, gleichen weitgehend ihren Kontrollen. Nur sind hier hin und wieder Zellzusammenlagerungen bemerkbar.

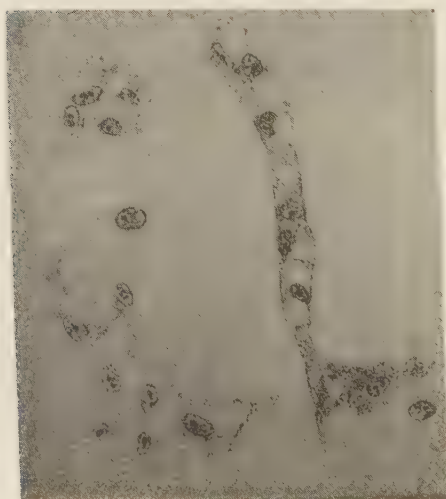


Abb. 26 : Zellzusammenlagerungen in einer Membranflaschenkultur, welche unter dem Einfluß der Stoffwechselprodukte von *B. subtilis* stand. (340-fache Vergrößerung)



Abb. 27 : Schematische
Darstellung von Zellen
aus der Kontrollkultur
zu Abb. 26.
(340-fache Vergrößerung)

Diskussion der Ergebnisse :

Bacillus subtilis erwies sich bei direkter Inkubation mit Fibroblasten absolut wachstumshemmend und gewebeauflösend. Bei Anwesenheit einer semipermeablen Membran sistierte das Wachstum, ohne daß eine Auflösung der Gewebekulturen und des Mediums erfolgte. Es blieb dann bei einer Zellzusammenlagerung im oben beschriebenen Sinn.

Wachstumshemmung durch Bacillus subtilis
(am Areal in % gemessen, bezogen auf die Kontrollkulturen)

Serien- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten :	
			24 Std.	48 Std.
-	22	Carrelflasche. Bacilleninokula- tion gleichzeitig mit dem Fibrobla- stenkulturansatz.	die Kulturen starben unter Auflösung ab. 100 %	
18	23	Carrelflasche. Bacilleninokula- tion 48 Stunden nach dem Fibrobla- stenkulturansatz.	das Wachstumsareal verringerte sich um 43 %	
19	24	Membranflasche : über und unter der Membran optimales Medium. Bacillen- inokulation gleich- zeitig mit dem Fi- broblastenkultur- ansatz.	75 %	kein weiteres Wachstum mehr.
20	25	Membranflasche : über und unter der Membran optimales Medium. Bacillen- inokulation 48 Std. nach dem Fibroblasten- kulturansatz.	11 %	kein weiteres Wachstum mehr.

P. B a c t e r i u m a e r o b a c t e r a e r o g e n e s

Aerogenes (l.c.52, 53) ist ein gramnegatives, unbewegliches Stäbchen, etwas plumper und dicker als E. coli, mit einer schleimigen Kapsel.

Die wichtigsten kulturellen und biochemischen Eigenschaften sind : Die Bakterien wachsen gut auf allen gebräuchlichen Nährböden. Die Kolonien sind rund, dick und schleimbildend. Gelatine wird nicht verflüssigt. - Indolbildung und Milchgerinnung sind keine konstanten Eigenschaften. Milchsucker, Traubenzucker, Maltose, Saccharose und Glycerin werden gespalten. In traubenzuckerhaltigen Nährböden werden nur die ersten 4 - 5 Tage Säure und Gas gebildet, deswegen fällt die Methylrotprobe negativ, die Voges-Proskauer-Reaktion positiv aus.

Die Bakterien werden im Boden, an Pflansen und im Darmkanal bei Säuglingen, aber auch bei Erwachsenen, besonders in den oberen Dünndarmschnitten, gefunden. Hauptsächlich kommt Aerogenes im Darmkanal von Kaltblütern (Fischen) und Insekten (Fliegen) vor.

Nach meinen Beobachtungen wächst Aerobacter gut auf dem für Fibroblasten optimalen Medium, aber nicht in runden, sondern in aufgelockerten, netzartig zusammenhängenden Kolonien.

Versuch m :

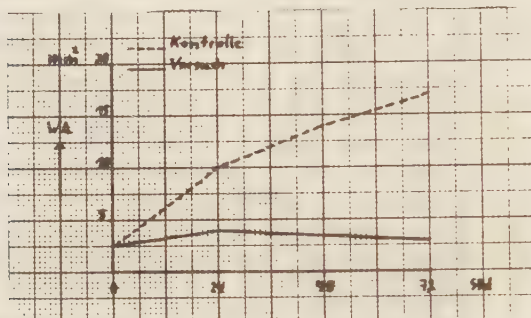
Versuchsanordnung :

Kulturgefäß : Carrelflasche; Kulturmedium: optimal. Inokulation der in Embryonal-extrakt aufgeschwemmten Bakterien bei Ansatz 26) : gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturan-satz, bei Ansatz 27) : 48 Stunden später. Inkubation 24 und 48 Stunden (bei Anordnung 26) bis zu 96 Stunden).

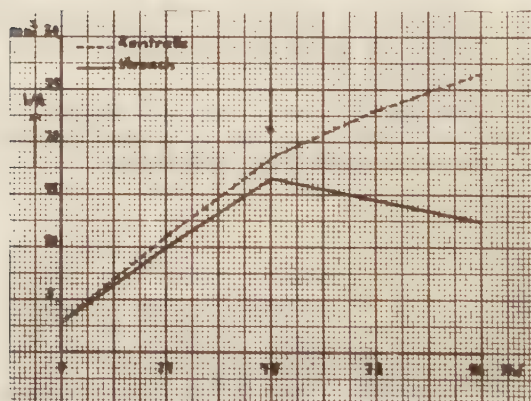
Makroskopische Beobachtung :

Gleichzeitig mit dem Ansatz infizierte Gewebekulturen konnten in den ersten 24 Stunden nur ganz wenig auswachsen. Bei weiterer Versuchsdauer verringerte sich das vorher erreichte Areal

wieder um ca. 32 % (Kurve 21). Die Kulturen des Ansatzes 2 verringerten vom Zeitpunkt des Beimpfens an ihr Areal um 60 % (Kurve 22).



Kurve 21



Kurve 22

Histologischer Befund :

Mäßiges Wachstum von *Aerobacter*, sowie eine kurze Einwirkungs-
dauer (24 Std.) konnten die Zellen nicht schädigen. Stärkeres
Bakterienwachstum, als auch längere Versuchsdauer, riefen jedoch nekrobiotische Veränderungen hervor: die Zellen sind geschrumpft und teilweise abgekugelt, die Kerne pyknotisch und zerfallen (Abb. 28).

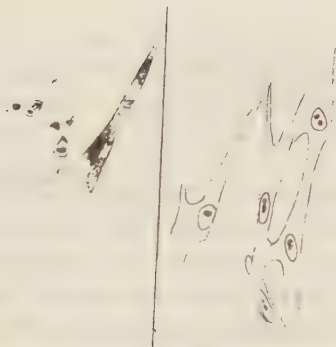


Abb. 28 : Links: stark geschädigte und geschrumpfte Zellen einer mit *Aerobacter* infizierten Carrelflaschenkultur. Rechts: schematische Darstellung von Zellen aus der dazugehörigen Kontrolle.
(340-fache Vergrößerung)

Versuch n :

Versuchsanordnung :

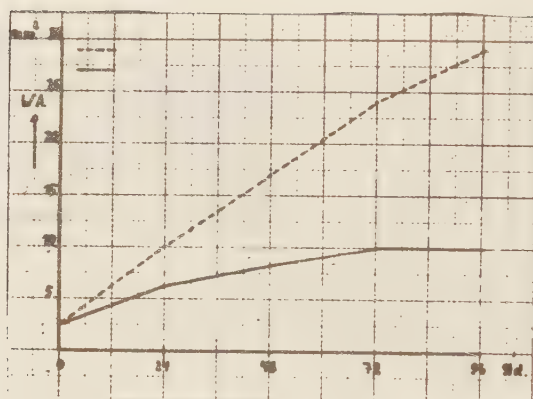
Kulturgefäß : Membranflasche. Kulturmedium: über und unter der Membran optimal. Inokulation der in Embryonalextrakt aufgeschwemmten Bakterien bei Ansatz 28) : gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 29) : 48 Stunden später. Inkubation 24 und 48 Stunden (bei Ansatz 28) bis zu 96 Stunden).

Makroskopische Beobachtung :

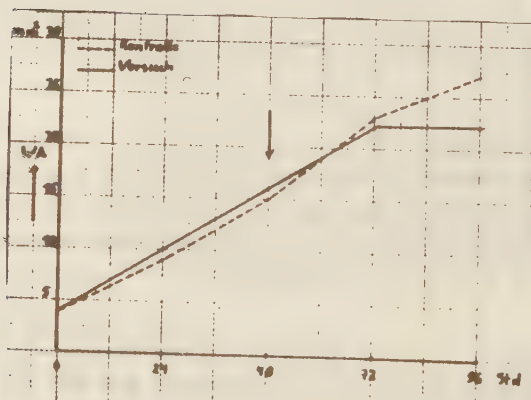
Während bei Versuchsanordnung 28) eine sehr starke Hemmung des Wachstums (65 %) zu bemerken war (Kurve 23), konnte bei Ansatz 29) in den ersten 24 Stunden kaum eine Hemmung beobachtet werden; dann allerdings sistierte das Wachstum.

Histologischer Befund :

Der histologische Befund deckt sich weitgehend mit dem bei Versuch m) beschriebenen. Die dort beschriebenen nekrobiotischen Veränderungen treten jedoch erst 24 Stunden später in Erscheinung.



Kurve 23



Kurve 24

Diskussion der Ergebnisse :

Sowohl bei dem Carrel-, als auch bei dem Membranflaschenversuch war bei sofortigem Zusatz der Bakterien eine Wachstumshemmung zu beobachten, die sich bei ersterem so stark auswirkte, dass nur noch ganz wenig Zellen auswachsen konnten.

Der Vergleich des histologischen Bildes beider Versuche zeigte, dass die nekrobiotischen Vorgänge bei direkter Berührung mit den Keimen viel schneller vor sich gingen. Auch bei Aerobacterzusatz nach 48 Stunden zeigten die Carrelflaschenkulturen größere Schädigung, als die Membranflaschenkulturen, welche kaum eine Veränderung erfuhren.

Dieser Versuch zeigte also, daß die toxischen Einflüsse der Keime durch die Membran deutlich abgeschwächt wurden.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch Bakterium
aerobacter (am Areal in % gemessen,bezogen auf die Kontroll-
kulturen).

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten :			
			24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 St
21	26	Carrelflasche. Bak- terieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblasten- kulturansatz.	80 %	Das Wachstumsa- real ging um 60 % zurück.	---	---
22	27	Carrelflasche. Bak- terieninokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	Das Wachstumsareal verringerte sich um 32 %.	---	---	---
23	28	Membranflasche: über und unter der Membran optimales Medium. Bak- terieninokulation gleichzeitig mit dem Fibroblasten- kulturansatz.	50 %	60 %	65 %	kein Wachst mehr.
24	29	Membranflasche: über und unter der Membran optimales Medium. Bak- terieninokulation 48 Std. nach dem Fibro- blastenkulturansatz.	5 %	kein wei- teres Wachs- tum mehr.	---	---

II. DER EINFLUSS VON PILZEN AUF FIBROBLASTEN IN DER GEWEBEKULTUR.

Die Frage einer Beeinflussung von Gewebeelementen durch Pilze ist insofern bedeutsam, als auch eine Reihe von pathologischen Zuständen bekannt ist, deren Ätiologie mit dem Pilzwachstum in Verbindung gebracht werden kann. Eine besondere Aktualität gewinnt das Problem neuerdings, weil in großen Maßstäben Versuche zur Therapie des malignen Wachstums angestellt wurden. Ich möchte an die Aufsehen erregenden, wenn auch sehr umstrittenen Versuche des Italieners Protti erinnern, welcher mit verschiedenen Hefen Krebs zu behandeln versuchte. Es sei ferner auch auf die großangelegten Versuche angesehener Laboratorien der Industrie hingewiesen, mit dem Ziel, aus Pilzen Antibiotica zu gewinnen, welche eine selektive Beeinflussung des Gewebewachstums haben sollen. Unabhängig von solchen Fragestellungen habe ich im Rahmen meiner Arbeit die Beeinflussung von Gewebekulturen durch Pilze zu erkennen versucht.

Bevor aber über die Durchführung der Experimente berichtet wird, möchte ich kurz auf jene pathologischen Veränderungen (l.c. 51 und 52) bei Mensch und Tier eingehen, die mich zu meiner Arbeit anregten: So entstehen z.B. Organveränderungen, besonders der Lunge, die tuberkuloseähnlich sind, durch *Coccidioides immitis*, einem Phycomyceten. Auch das meist tödliche, sogenannte brasilianische Granulom, Schleimhautpolypen und Verpilzung der Atemwege der Vögel, werden durch niedere Pilze hervorgerufen. Eine Art (*Empusa muscae*) tötet Fliegen durch Verpilzen. Sowohl unter den Phycomyceten als auch unter den Eumyceten sind einige Arten bekannt, die im äußeren Gehörgang des Menschen gedeihen; andere wuchern in den Genitalien und Placenten der Kühe, wodurch sie Verkalben hervorrufen.

Unter den Eumyceten sind ferner einige Arten pathogen, wie z.B. einige Hefen, die soorartige Angina, diphtherieähnliche Epidemien, nässende Entzündungen, Haut- und Nagelbettentzündungen und Hautgeschwüre verursachen. Viele hefeartige Pilze

wurden auch bei der tropischen Soor gefunden. Besonders hervorzuheben in Bezug auf meine Untersuchungen ist *Torula utilis*; ferner *Candida albicans*, die als Erreger des "Soor" bekannt ist. Auch unter den Schimmelpilzen können einige Arten pathogen werden und Lungenverpilzung, Lungenasthma beim Menschen und die Starr- oder Kalksucht der Seidenraupe verursachen. Einen Teil der Haut- und Haarpilze findet man auf der normalen Haut, z.B. *Torulopsiden*. Andere erzeugen Pilzhautkrankheiten, (Flechten, Ekzeme, Mykosen).

Es wäre wünschenswert, diese krankheitsverursachenden Pilze auf ihre Beeinflussung des Bindegewebewachstums in vitro zu studieren. Aus technischen Gründen musste ich mich aber auf die Untersuchung von zwei Pilzarten beschränken.

2. Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums durch nicht symbiontische Hefen :

1. *Candida albicans* :

Candida albicans (Syn. *Oidium albicans*) (l.c. 51, 52, 55, 56 und 60) ist bekannt als Erreger des Soor. Dieser Pilz gehört systematisch zu den Mycotoruloidea (l.c. 60). Die Hyphen sind 3 - 4 μ dick, die Sproßzellen 3 - 4 mal 2-5 μ groß. Die Vermehrung geschieht durch hefeartige Sprossung. Biochemische Eigenschaften: Glukose und Maltose werden kräftig vergoren, Gallaktose nur schwach. Saccharose nur im sauren Bereich. Harnstoff wird assimiliert. Wachstum erfolgt innerhalb eines pH - Bereiches von 2,9 - 9,6. *Candida albicans* wächst gut auf allen üblichen Nährböden. Die Sproßketten dringen tief in den Agar ein. Er vermag unbelebte organische Substanz zu zersetzen (= Saprophyt). Vorzugsweise wächst *Candida albicans* auf Schleimhäuten, kommt aber auch auf der Haut vor. Einen gesunden Körper schädigt er in keiner Weise.

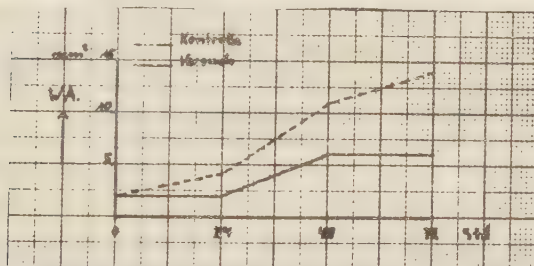
Versuch o :

Versuchsanordnung:

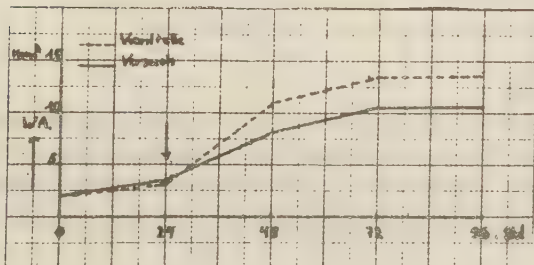
Kulturgefäß : Carrelflasche; Kulturmedium : optimal
Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonalextrakt
bei Ansatz 30): gleichzeitig mit dem Fibroblasten-
kulturansatz. Bei Ansatz 31): 24 Stunden und bei An-
satz 32): 48 Stunden später. Inokulation bei Ansatz
30) und 31): 24 und 72 Stunden, bei Ansatz 32): 24
und 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

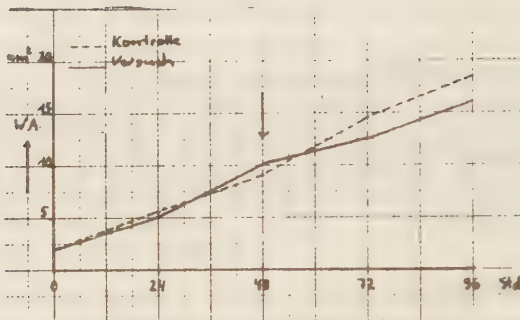
Gleichzeitig mit dem Ansatz beimpfte Gewebekulturen wuchsen
erst nach 24 Stunden ein klein wenig aus (Kurve 25). 24 Stun-
den später inokulierte Kulturen wurden ebenfalls stark gehemmt
(Kurve 26), weniger die 48 Stunden nach Ansatz beimpften (Kur-
ve 27).



Kurve 25



Kurve 26



Kurve 27

Histologischer Befund :

Nach 24 Stunden hat sich *Candida albicans* stark vermehrt und wuchert rasenbildend in langen Sproßketten über Kultur und Medium. Trotzdem zeigen die Kulturen keine Schädigung. Nach 72-stündiger Beeinflussung (bei Ansatz 32) nach 48 Std.) haben sich die Hefen noch stärker vermehrt. Die Versuchskulturen zeigen dann, als einzige Abweichung gegenüber den Kontrollen, z. T. Hungerfibroblasten und abgerundete Zellen; (diese geringe Schädigung könnte vielleicht eine Folge des durch *Candida albicans* verursachten Nahrungsentzuges sein).

Versuch o (Ansatz 33)):

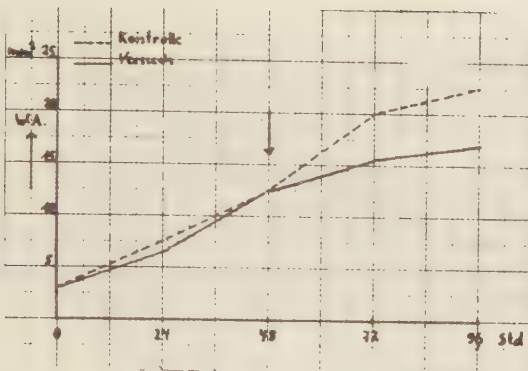
Zu diesem Versuch wurden g e s c h w ä c h t e Ausgangskulturen verwendet (Versuchsbedingungen wie bei Versuch o) Ansatz 32).

Makroskopische Beobachtung :

Die Wachstumshemmung betrug 27 - 28 % (Kurve 28).

Histologischer Befund :

Die schon zu Versuchsbeginn geschwächten Gewebekulturen wurden von *Candida albicans* stark geschädigt: man beobachtet nur noch "Hungerfibroblasten", abgerundete Zellen und Übergangsformen zwischen beiden. Kerne mit allen Anzeichen der Degeneration herrschen vor.



Kurve 28

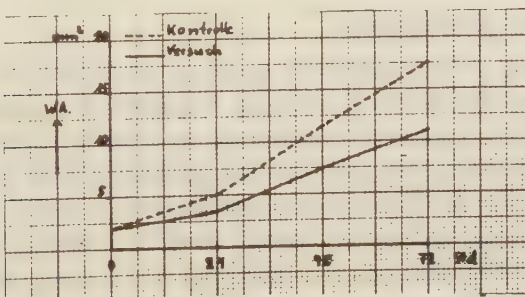
Versuch p :

Versuchsanordnung:

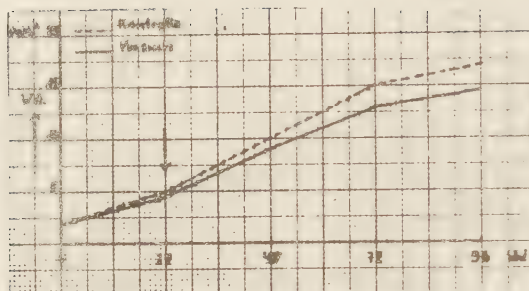
Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium: über der Membran optimal, unter der Membran Tyrodelösung. Inokulation der Hefe aufschwemmung in Tyrodelösung bei Ansatz 34); gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz, bei Ansatz 35): 24 und bei Ansatz 36): 48 Stunden später.
Inkubation : 24 und 72 Stunden

Makroskopische Beobachtung :

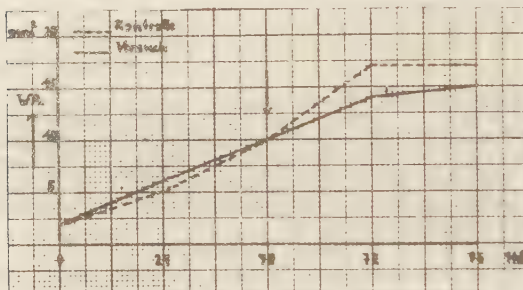
Wie bei Versuch o) wurden wieder die seit Beginn des Versuches unter dem Einfluss der Hefen stehenden Gewebekulturen am meisten gehemmt (Kurve 29) und die 48 Stunden später beeinflussten am wenigsten (Kurve 31); dazwischen stehen die Kulturen, bei denen der Versuch 24 Stunden nach Ansatz begonnen wurde (Kurve 30).



Kurve 29



Kurve 30



Kurve 31

Histologischer Befund :

Alle Kulturen des Versuchsansatzes p) gleichen nach 24-stündiger Versuchsdauer den Kontrollen. Nach 72 Stunden aber läßt sich eine deutliche Degeneration erkennen: Die Versuchsgewebe weisen dann hauptsächlich Hungerfibroblasten und abgerundete Zellen auf. Auch die Kerne zeigen deutliche Degenerationsmerkmale.

Diskussion der Ergebnisse:

Candida albicans vermochte bei direkter Berührung mit den Fibroblastenkulturen das Gewebe am Wachstum zu hemmen. Das Auftreten einiger Hungerfibroblasten wies auf die ersten geringfügigen Schädigungen hin. Diese Schäden führe ich, wie bereits erwähnt, auf die Nahrungskonkurrenz zurück; toxische Einflüsse dürften meines Erachtens kaum eine Rolle spielen. Bei Membranflaschenkulturen konnte ich die Gewebe unter schlechten Bedingungen beobachten, indem Tyrodelösung statt wie gewöhnlich Embryoextrakt unter die Membran gegeben wurde.

Es zeigte sich, daß diese Kulturen früher als beim Carrel-flaschenversuch degenerative Merkmale aufwiesen.

In keinem Fall konnten herbegefüllte Zellen beobachtet werden.

Bei all diesen Versuchen zeigte sich also, daß die Gewebe in vitro im Prinzip genauso auf Soorbefall reagieren, wie in situ: gesunde Gewebe bleiben fast unbeeinflusst, während geschwächte mehr oder weniger geschädigt werden.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch Candida albicans

(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen).

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten :		
			24 Std.	48 Std.	72 Std.
25	30	Carrelflasche; Hefe- inokulation gleich- zeitig mit dem Fibro- blastenkulturansatz.	100 %	60 %	kein weite- res Wachs- tum mehr.
26	31	Carrelflasche; Hefe- inokulation 24 Stunden nach dem Fibroblasten- kulturansatz.	37 %	24 %	24 %
27	32	Carrelflasche; Hefe- inokulation 48 Stun- den nach dem Fibrobla- stenkulturansatz.	16 %	12 %	—
28	33	Carrelflasche; Hefe- inokulation 48 Stun- den nach dem Ansatz einer geschwächten Fibroblastenkultur.	27 %	28 %	—
29	34	Membranflasche; über der Membran optimales Medium, unter der Mem- bran Tyrodelösung. Ino- kulation gleichzeitig mit dem Fibroblasten- kulturansatz.	47 %	42 %	42 %
30	35	Membranflasche; über der Membran optimales Medium, unter der Mem- bran Tyrodelösung, He- feinokulation 24 Std. nach dem Fibroblasten- kulturansatz.	15 %	15 %	15 %
31	36	Membranflasche; über der Membran optimales Medium, unter der Mem- bran Tyrodelösung. Hefeinokulation 48 Std. nach dem Fibroblasten- kulturansatz.	20 %	12 %	---

B. Torula utilis :

Torula (Syn. *Torulopsis*) *utilis* (l.c. 51, 53, 60) gehört zu den *Torulopsidaceae*. *T. utilis* ist eine rundliche grampositive Zelle, vielfach mit doppelt konturierter Membran.

Biochemische Eigenschaften : Die meisten Zucker werden vergoren. Auf die Vergärung von Pentosen ist besonders hinzuweisen. Die Alkoholbildung ist nicht kräftig.

Der Eiweißgehalt der Hefen beträgt 50 - 55 %. Wegen seiner Hochwertigkeit wird *Torula utilis* als Futterhefe verwendet.

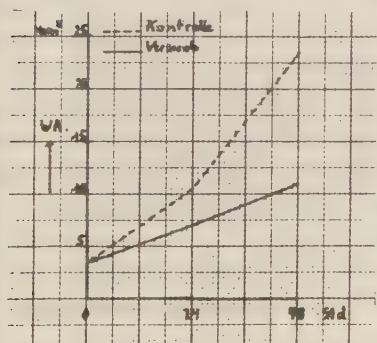
Versuch q :

Versuchsanordnung:

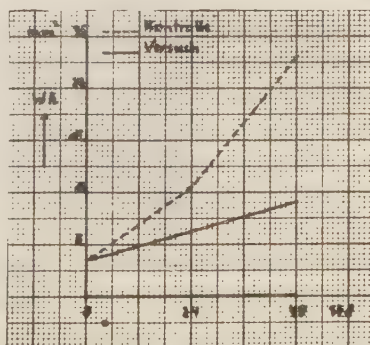
Kulturart : hängender Tropfen (= Deckglaskultur)
Versuchsmedium bei Ansatz 37) : optimal, bei Ansatz 38) : wurde in "Hungermedium" (= 1:5 mit Tyrodelösung verdünntes optimales Medium) gezüchtet. Inokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturan-satz. Inkubation 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die Kulturen des Ansatzes 37) wurden um 50 - 62 % (Kurve 32), die des Ansatzes 38) um 57 - 72 % gehemmt (Kurve 33).



Kurve 32



Kurve 33

Histologischer Befund :

Der histologische Befund beider Ansätze deckt sich weitgehend. Das Hefewachstum im freien Medium entspricht dem in dem später zu besprechenden Leerversuch. Auch im Bereich des Wachstumshofes der Fibroblastenkultur ist gutes Wachstum der Hefen zu verzeichnen. Im Bereich des Mutterstückes dagegen, liegen höchstens vereinzelte Hefen, nie größere Verbände. Wo aber die Hefen mit den Fibroblasten in Berührung stehen, zeigen ihre Kolonien außer den normalen (s. Leerversuch), noch andere Erscheinungsformen. Es fällt auf, daß die meisten Kolonien nicht so kompakt sind, also sichtlich aus weniger Hefezellen bestehen. Daneben sieht man aber vollkommen abgerundete Hefepakete, die von einer deutlichen Membran umgeben sind. Ihre Größe entspricht den Rundzellen. Zweifellos handelt es sich um abgekugelte infizierte Fibroblasten, denn da und dort läßt sich noch einwandfrei ein Zellkern nachweisen (Abb. 29 b). Die histologische Auswertung der Fibroblastenkulturen ergibt, daß es sich stets um lebensfähige Kulturen handelt. Sie weichen nur in zwei Punkten von den Kontrollkulturen ab :

1. können Fibroblasten beobachtet werden, deren Zellgrenzen nicht glatt und scharf sind, wie es der Norm entspricht, sondern tropfenförmige Fortsätze und Ausstülpungen zeigen, wie sie auch im Versuch g) beobachtet wurden (Abb. 32). Es handelt sich hierbei eindeutig um Plasmaabschnürungen oder Ausstoßung. Kern und Plasma dieser Zellen sind normal. Weiterhin fallen normale Fibroblasten auf, die ebenfalls Hefezellen eindeutig intracellulär beherbergen (Abb. 29, 30, 31). Besonders interessant ist die Beobachtung, daß die Hefen keine Sprossung zeigen, wie sie im freien Medium häufig beobachtet werden. Weiterhin fällt auf, daß die Zellen einzeln oder zu mehreren in Vakuolen liegen. Ähnliches hat auch Fuchta (59) bei seinen Untersuchungen gefunden. Sonst sind die Fibroblasten in keiner Weise geschädigt, nur hin und wieder ist bei Anwesenheit vieler Hefezellen der Kern der Fibroblastenzelle leicht eingedellt (Abb. 29).

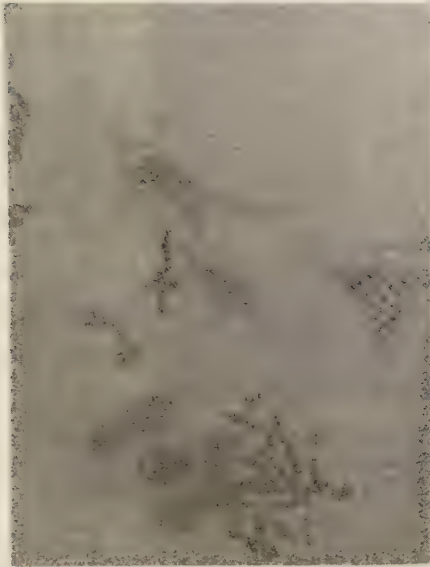


Abb. 29 : Fibroblasten, welche mehr oder weniger stark mit *Torula utilis* beladen sind (aus einer mit *T. utilis* beimpften Deckglaskultur). Links unten (a) eine abgerundete Zelle mit deutlichem Kern; rechts oberhalb davon eine hefegefüllte Rundzelle mit deformiertem Kern (b). (340-fache Vergrößerung)

Die Abbildung ist aus verschiedenen Stellen derselben Kultur zusammengestellt.

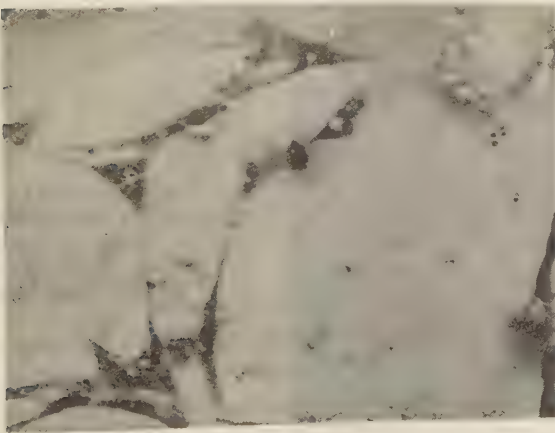


Abb. 30 : Fibroblasten, welche z.T. mit *T. utilis* beladen sind (Mikrophotographie). (ca. 300-fache Vergrößerung).

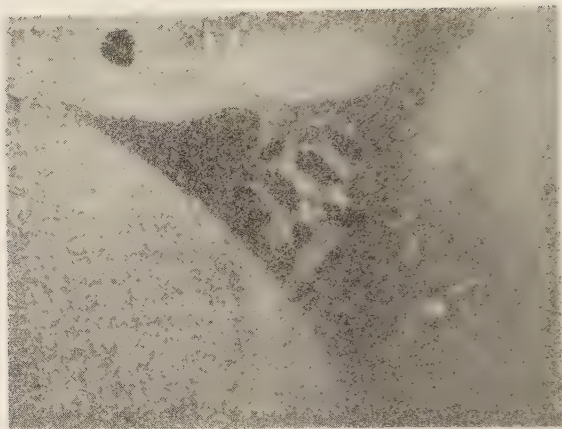


Abb. 31 : Fibroblast - mit Hefeeinschlüssen (Ausschnitt aus Abb. 33) (ca. 1.500-fache Vergrößerung).
(Für die Mikrophotographie bin ich Herrn Professor Skell zu Dank verpflichtet.)

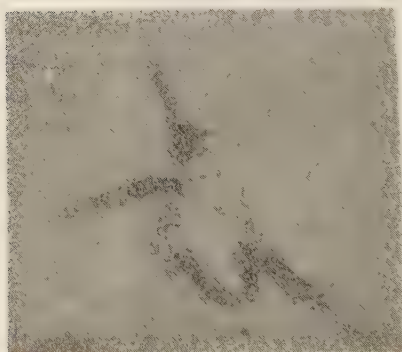


Abb. 32 : Fibroblasten mit Plasmaabschnürungen. Siehe Erklärung im Text.
(340-fache Vergrößerung).

Versuch r : (Versuchsansatz 34)

Versuchsanordnung:

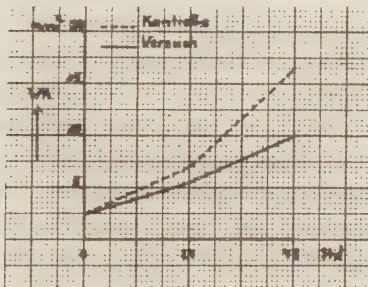
Kulturgefäß : Membranflasche, Kulturmedium : über und unter der Membran optimal. Inokulation der in Embryonalextrakt aufgeschwemmten Hefen gleichzeitig mit dem Ansatz der Fibroblastenkulturen. Inkubation 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die Kulturen wurden um 33 - 46 % gehemmt (Kurve 34).

Histologischer Befund :

Die Versuchskulturen gleichen vollkommen ihren Kontrollen.



Kurve 34

Leerversuch :

Zu jeder der beschriebenen Versuchsreihen wurden zur Kontrolle des Hefewachstums Versuche angestellt, bei denen sämtliche oben beschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten, aber die Fibroblastenkulturen weggelassen wurden.

Die Hefen zeigen bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C gutes Wachstum. Sofort nach Ansatz fixiert, sind im Gesichtsfeld (Obj.20, Ok.12) durchschnittlich 15 - 20 einzeln liegende Hefen vorhanden. Da und dort erkennt man kleine Sproßverbände aus 2 - 3 Zellen. Nach einer 48-stündigen Bebrütungsdauer sind diese Knospungsverbände zu runden, an der

Peripherie strahligen Kolonien ausgewachsen. Größe und Dichte dieser Kolonien sind starken Schwankungen unterworfen, genauso die Gestalt der Hefezellen. Durch Auftreten großer Vakuolen (Fett ?) wird das Protoplasma der Hefezellen an die beiden Pole gedrängt (Abb. 29).

Diskussion der Ergebnisse :

An Hand der Wachstumskurven zeigt sich, daß bei räumlicher Trennung von Fibroblastenkulturen und Hefen die Wachstumshemmung am geringsten ist, während sie bei direktem Kontakt und Verwendung eines Hungermediums recht erheblich ist (siehe Wachstumskurven). Daraus geht eindeutig hervor, daß eine Nahrungskonkurrenz zwischen Fibroblasten und Hefen besteht. Da die Verteilung der Hefen im Hungermedium jener im optimalen Medium entspricht, kann gesagt werden, daß die Nahrungskonkurrenz zugunsten der Hefen entschieden wurde. Sogar im Bereich des Wachstumshofes der Fibroblastenkultur selbst vermögen die Hefen sich zu behaupten, nicht so gut dagegen auf dem Mutterstück. Das Interessanteste ist dabei, daß die Hefezellen in die Gewebszellen aufgenommen werden, gleichgültig, ob es sich um Rundzellen oder Fibroblasten handelt. Wie es zu diesen Einlagerungen gekommen sein mag, kann nicht gesagt werden. Doch lassen sich einige Vermutungen aussprechen : 1. Könnte man an Phagocytose denken, 2. an aktives Eindringen der Hefezellen in die Gewebezellen, wie das bei Insektensymbionten so häufig beobachtet wurde. Allerdings weisen die Vakuolen, in welche die Hefen eingeschlossen sind, darauf hin, daß in diesem Fall noch keine harmonische Einfügung der Hefezellen in die Wirtszelle erfolgt. Die Vakuolenbildung weist auf lytische Vorgänge hin, die sich in den Fibroblasten abspielen. Leider konnten diese Kulturen nicht weiter verfolgt werden und so läßt sich vorerst nichts über das weitere Schicksal der aufgenommenen Hefen aussagen.

Auch lassen sich vorläufig noch keine Mutmaßungen über die Ursachen der Plasmaabschnürungen aussprechen. Ähnliches hatte

ich ja auch bei bakterieller Schädigung der Fibroblastenzelle beobachtet (s. Versuch g). Man weiß aus den Versuchen anderer Autoren, daß mitunter Sauerstoffmangel dafür verantwortlich zu machen ist. Ich selbst habe bisher keine derartigen Versuche angestellt, möchte sie aber demnächst nachholen. Der Umstand, daß die Plasma-Extrusionen nur bei unmittelbarer Berührung der Fibroblasten mit den Hefen erfolgen, bei Zwischenschaltung einer Cellophanmembran aber nicht, weist darauf hin, daß hochmolekulare Stoffwechselprodukte der Hefen dabei eine Rolle spielen dürften.

Wachstumshemmung der Fibroblastenkulturen durch Torula utilis
(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen).

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten	
			24 Std.	48 Std.
32	37	hängender Tropfen : (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblasten- kulturansatz.	50 %	62 %
33	38	hängender Tropfen : (Hungermedium) Hefe- inokulation gleich- zeitig mit dem Fibro- blastenkulturansatz.	57 %	72 %
34	39	Membranflasche : über und unter der Membran optimales Medium; Hefeinokula- tion gleichzeitig mit dem Fibroblastenkul- turansatz.	33 %	46 %

B. Die Beeinflussung des Fibroblastenwachstums durch die symbiontischen Hefen von Bockkäfern:

Von der Vielzahl der Hefen, die in der Natur vorkommen und von Bedeutung für das tierische Leben sind, interessieren uns besonders die symbiontischen Hefen, welche, wie P. B u c h n e r (l.c. 1), A. K o c h (l.c. 2-5) und ihre Schüler (57) zeigten, in bestimmten Organen (Mycetomen) oder Darmabschnitten niederer Tiere ansässig sind. Man weiß, daß sie Stoffwechselprodukte, insbesondere Vitamine des Vitamin-B-Komplexes erzeugen, welche für die Entwicklung des Wirtes von lebenswichtiger Bedeutung sind. G r ä b n e r , H e i t z (61) und S c h w a r t z (62) konnten verschiedene Hefearten aus solchen symbiontischen Organen in Reinkulturen züchten und so der biologischen Forschung zugänglich machen. Solche isolierten Symbiontenstämme sind ein günstiges Ausgangsmaterial für Re-Infektionsversuche an künstlich symbiontenfreien Tieren, wie sie B l e w e t t und F r a e n k e l (63) mit Lasioderma und Sitodrepa angestellt hatten. Augenblicklich ist auch Herr F o e c k l e r (nach mündlicher Mitteilung) dabei, auf breiterer Basis derartige Synthesen von Symbiosen an symbiontenfreien Anobiiden durchzuführen.

Nicht minder lockend aber sind Neuschöpfungen von Symbiosen durch Einführung symbiontischer Hefen in Gewebskulturen. Vor 20 Jahren haben bereits R. u. M. B u c h s b a u m Chlorella vulgaris, eine Alge, welche häufig Symbiosen mit Protozoen und niederen Metazoen eingegangen ist (s. Buchner 1930 (64)), auf Gewebekulturen (von Axolotl u. Hühnerembryonen) verimpft. Sie fanden, dass Kulturen, die sie zusammen mit Algen im Licht gezüchtet hatten, nicht so oft umgesetzt zu werden brauchten, wie die Kontrollkulturen, welche im Dunklen gehalten wurden. Beide Autoren schließen daraus auf stoffwechselphysiologische Wechselbeziehungen, die im wesentlichen außer einer besseren Versorgung mit Sauerstoff in einer Entgiftung des Mediums durch die Chlorellen zum Ausdruck kommen. Stoff-

wechselgifte der Fibroblasten, welche das regelmäßige Umsetzen der Gewebekulturen notwendig machen, können von den im gleichen Medium gezüchteten Chlorellen verarbeitet und so unschädlich gemacht werden. Dafür spricht noch, daß bei diesen Kulturen die starke Fettspeicherung in den Zellen ausblieb, welche ein charakteristisches Merkmal in vitro gezüchteter Zellen ist.

O. P u c h t a (1954) war der Erste, der symbiontische Hefen in Gewebekulturen erfolgreich implantierte. Er beimpft Hühnerherzfibroblasten mit den Hefen des Bockkäfers *Rhagium inquisitor* und konnte beobachten, dass dieselben in ähnlicher Weise wie sonst in Insektenzellen nunmehr auch in Wirbeltierzellen aufgenommen wurden. Außerdem stellte Puchta fest, daß die Gewebe auf die symbiontischen Hefen und andere nichtsymbiontische Keime eine wachstumshemmende Wirkung ausübten, die durch Zwischenschalten einer Cellophanmembran verringert werden konnte. Puchta nahm an, daß es sich entweder um Hemmstoffe handelte, welche von den Geweben produziert wurden, oder daß gewisse, für die Symbionten lebenswichtige Stoffe des gemeinsamen Nährsubstrates, von den Geweben verbraucht wurden. - Andererseits schädigten zu hohe Konzentrationen der symbiontischen Hefen das Gewebe. Zwischenschalten einer Cellophanmembran verhinderte die Schädigung. O. Puchta konnte außerdem Auflockerungserscheinungen an den Nukleolen der Fibroblastenkerne beobachten, die er auf Veränderungen des Stoffwechsels zurückführte. Eine von symbiontischen Hefen induzierte wachstumsfördernde Wirkung konnte Puchta nicht mit Sicherheit nachweisen.

Bei meinen eigenen Versuchen kam es mir darauf an, die Puchtaschen Ergebnisse nach verschiedenen Richtungen hin zu erweitern.

1 Rhagium bifasciatum :

Die Hefen leben symbiontisch in den Zellen der Mitteldarmblindsäcke der Larve des Bockkäfers, *Rhagium bifasciatum* (= zweibindiger Nadelholzbock). Sie haben birnenförmige Gestalt. Ihre Größe beträgt $2,1 - 3,4 \times 2,5 - 7 \mu$. Sie wachsen in Sproßverbänden zu 3 - 6 Hefezellen vereint. Die Sproßung erfolgt am stumpfen Pol. K.E. Gräbner (l.c. 57) ordnet diese symbiontischen Hefen systematisch den Mycotoruloiden zu und zwar der Gattung *Candida*. Er bewertet die Symbionten als eine neue Varietät von *Candida tenuis*. Die symbiontischen Hefen des Bockkäfers *Rhagium bifasciatum* produzieren nach Gräbner die gleichen Wirkstoffe wie die Bierhefe und *Torula utilis*. Nach eigenen Erfahrungen wachsen die Hefen gut auf den gebräuchlichen Nährmedien (Nähragar Merk) auch bei 37° C.

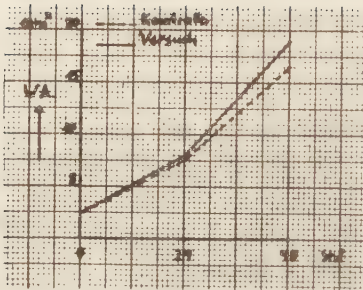
Versuch s :

Versuchsordnung :

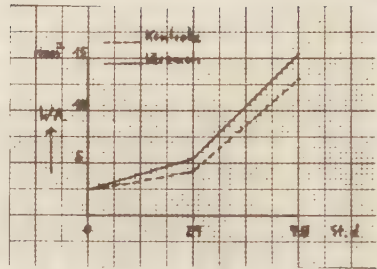
Kulturart : hängender Tropfen (= Deckglaskultur)
Kulturmedium bei Ansatz 40): optimal, bei Ansatz 41): 1 : 5 (= "Hungermedium") und bei Ansatz 42): 1:10 mit Tyrodelösung verdünnt (= "extremes Hungermedium"). Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonal-extrakt (der bei den einzelnen Ansätzen im gleichen Verhältnis verdünnt wurde) : gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz. Inkubation 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Es war eine geringe Wachstumsförderung der infizierten Kulturen der Ansätze 40 (Kurve 35) und 41 (Kurve 36) bis ca. 15 - 20 % festzustellen. Bei zu starker Verdünnung des Versuchsmediums (Ansatz 42) wurde das Wachstum völlig unterdrückt



Kurve 35



Kurve 36

Histologischer Befund:

Die Kulturen des Ansatzes 40 und 41 gleichen vollkommen ihren Kontrollen. Die Hefen sind wie in der Leerkontrolle gleichmäßig, eher spärlicher, über Kultur und Medium verteilt. Es liegen also völlig normale ungeschädigte Fibroblastenkulturen vor. Auch da, wo der Kontakt zwischen Fibroblasten und Hefezellen sehr eng ist, bemerkt man keine Schädigung. Doch fallen hier Zellen auf, in welchen übereinstimmend mit den Untersuchungen Puchta's Hefezellen eingeschlossen sind (s. Abb. 33). Man wird dabei an das Bild einer Phagocytose erinnert.

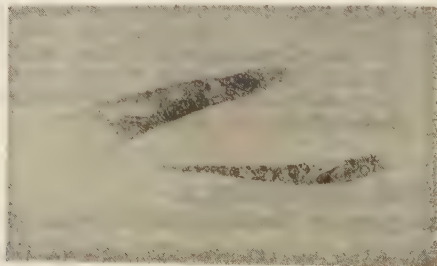


Abb. 33 : Fibroblasten aus einer Deckglaskultur mit den symbiontischen Hefen des Käfers *Rhagium bifasciatum* als Einschlusskörper. (340-fache Vergrößerung)

Versuch t :

Versuchsanordnung:

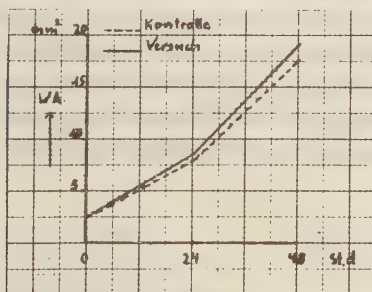
Kulturgefäß: Membranflasche. Kulturmedium : über und unter der Membran optimal. Inokulation der Hefe aufschwemmung in Embryonalextrakt gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz. Inkubation 48 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die Versuchsgewebe wiesen ein etwas besseres Wachstum (10 %) als die Kontrollen auf (Kurve 37).

Histologischer Befund :

Die Versuchsgewebe zeigen weitgehende Übereinstimmung mit den Kontrollen.



Kurve 37

Leerversuch :

In einer zweiten Kontrollreihe wurden zur Überprüfung des Symbiontenwachstums unter genau den gleichen Bedingungen und unter Fortlassung der Fibroblasten die Rhagium-

hefen allein angesetzt. Um ein vergleichbares Maß für die Einsaatdichte zu haben, wurde unmittelbar nach dem Ansatz und nach 48-stündiger Bebrütungsdauer ausgezählt. Zu Beginn des Versuches zählte ich (bei Obj. 20 Ok 12) im Durchschnitt 13 - 15 meist einzeln liegende Hefezellen im gleichen Gesichtsfeld. Nach 48-stündiger Bebrütungsdauer konnten bei gleicher Vergrößerung im Gesichtsfeld ca. 10 Sproßketten und ca. 2 - 5 einzeln liegende Hefezellen beobachtet werden.

Diskussion der Ergebnisse :

Die Versuche ergaben eine geringfügige Wachstumsförderung der Versuchsgewebe durch die symbiontischen Hefen, die besonders deutlich war, wenn in einem Hungermedium gestüchtet wurde.

Bei zu starker Verdünnung des optimalen Mediums mit Tyrodelösung erfolgte aber auch trotz der zugesetzten Symbionten kein Wachstum mehr. An geeigneten Stellen (bei unmittelbarem Kontakt der Fibroblasten mit den Mikroorganismen) kam es in Deckglaskulturen zur Aufnahme von Symbionten in die Fibroblastenzellen.

Wachstumsförderung der Fibroblastenkulturen durch die
symbiontischen Hefen aus dem Bockkäfer Rhagium bifasciatum
(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen).

Vers.- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten:	
			24 Std.	48 Std.
35	40	hängender Tropfen (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturan- satz.	9 %	15 %
36	41	hängender Tropfen (Hungermedium = 1:5 verdünntes optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	25 %	19 %
	42	hängender Tropfen (extremes Hungerme- dium = 1:10 verdünntes optimales Medium) Hefeinokulation gleich- zeitig mit dem Fibro- blastenkulturansatz.	keinerlei Wachstum	
	43	Membranflasche: über und unter der Membran optimales Medium. Hefeinokula- tion gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	10 %	10 %

2. S p o n d y l i s b u p r e s t o i d e s

Die Hefen leben symbiontisch in den Darmblindsäcken der Larve des Bockkäfers *Spondylis buprestoides*. Die Symbionten haben eine ovale bis längliche, z.T. runde bis tropfenförmige Gestalt. Häufig sind sie in Sproßverbänden anzutreffen. Ihre systematische Stellung ist noch unbekannt, genau wie ihre Wirkstoffproduktion.

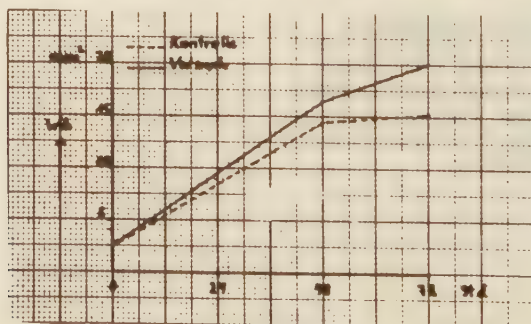
Versuch u :

Versuchsanordnung :

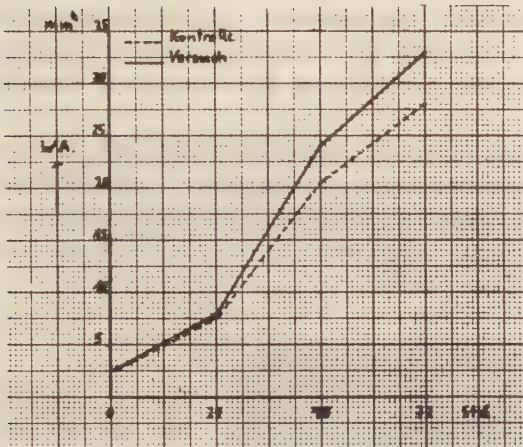
Der Versuch u) wurde sowohl in der Carrelflasche (Ansatz 44) und 45)), als auch auf dem Deckglas (Ansatz 46) mit optimalem Medium durchgeführt. Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonal-extrakt gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz. Inkubation bei Ansatz 44) und 46): 72 Std bei Ansatz 45) wurde sie noch weitere 48 Std. fortgesetzt.

Makroskopische Beobachtung :

Es zeigte sich eine deutliche Wachstumsförderung der beimpften Kulturen, die bis zu 30 % betragen konnte. (Kurve 38 u. 39)



Kurve 38 (Ansatz 44)



Kurve 39
(Ansatz 46)

Histologischer Befund :

Die Hefen zeigen überall gutes Wachstum und sind gleichmäßig über Kultur und Medium verteilt. Bei allen, 72 Std. lang beeinflussten, Versuchsansätzen gleichen sich die histologischen Bilder von Versuchs- und Kontrollgewebe weitgehend. Bei einer Kultur, bei welcher durch Zufall beim Beimpfen auf die eine Hälfte der Kultur ein großer Symbiontenverband hingelange, die andere Seite aber symbiontenfrei blieb, zeigt sich kein Unterschied im Wachstum und histologischen Bild der beiden Hälften.

Nach Fortsetzung des Versuches um weitere 48 Stunden (Ansatz 45), konnte ich folgende Beobachtung machen: Die Konzentration der zugegebenen Hefeaufschwemmung entsprach genau jener von Versuchsansatz 44, da beide zur gleichen Zeit angesetzt wurden. Aber trotz der 48 Stunden längeren Bebrütungsdauer entspricht die Lagerungsdichte der Hefen jener von Versuchsansatz 44) mit nur 72 Stunden Bebrütung. Dies deutet darauf hin, daß nach einer ganz bestimmten Zeit die Vermehrung der Hefen aufhörte.

Der Grund dafür kann entweder die Erschöpfung der Nahrung des Mediums sein, oder aber Hemmstoffe der Gewebe dämmten die Vermehrung der Hefen ein. Erstere Annahme trifft wohl eher zu. - Das histologische Bild von Versuchs- und Kontrollgeweben stimmt überein. Hier wie dort bemerkt man Anzeichen einer Degeneration, wie sie bei älteren Kulturen auch normalerweise auftritt.

Bei vielen Kulturen des Versuches u) findet man im Plasma einiger Zellen, und zwar sowohl der normalen spindelförmigen, als auch der abgekugelten, symbiontische Hefen eingeschlossen. In manchen lagen nur einige wenige, in anderen dagegen mehr als ein Dutzend (Abb. 34).

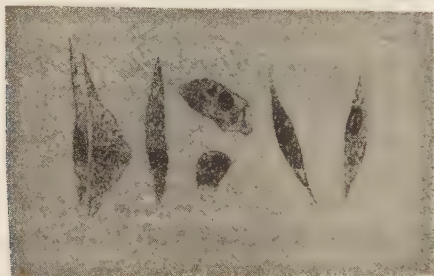


Abb. 34 : Fibroblasten mit symbiontischen Hefen des Käfers *Spondylis buprestoides* als Einschlusßkörperchen (340-fache Vergrößerung)

Versuch v : (Ansatz 47)

Versuchsanordnung:

Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium : optimal, Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonalextrakt 48 Stunden nach Ansatz der Fibroblastenkulturen. Inkubation 72 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die Wachstumskurve zeigt gleichen Verlauf von Kontroll- und Versuchsgewebe. Dies beweist, daß die Fibroblastenkulturen nach Ablauf der Wachstumsperiode auf die ~~wachstumsfördernde~~ Wirkung der Symbionten nicht mehr ansprechen.

Das histologische Bild von Versuchs- und Kontrollgewebe deckt sich mit dem von Versuchsansatz 46).

Versuch x :

Versuchsanordnung:

Der Versuch wurde sowohl in der Carrelflasche (Ansatz N 48), als auch auf dem Deckglas (Ansatz N 49 und 50) durchgeführt.

Inokulation der Hefeaufschwemmung in, dem Ansatz entsprechend verdünnten Embryonalextrakt, gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz.

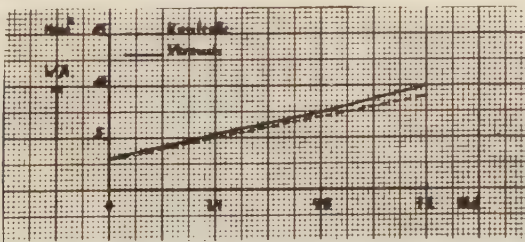
Inkubation 72 Stunden.

Zur Durchführung des Ansatzes 48) und 49) wurde "Hungermedium" (s.o.) verwendet und bei Ansatz 50) "extremes Hungermedium" (s.o.).

Makroskopische Beobachtung :

Die Kulturen der Ansätze 48) und 49) zeigten zwar Wachstum, erreichten aber nicht die Ausdehnung von Kulturen in optimalem Medium. Die Wachstumskurve läßt eine kleine Begünstigung der beimpften Kulturen erkennen (ca. 5 - 15 %) (Kurve 40).

Die Kulturen des Ansatzes 50 konnten nicht auswachsen.



Kurve 48

Histologischer Befund der Kulturen des Ansatzes 48) und 49).

Das Wachstum der Hefen ist spärlich. Ein Teil der Gewebe zeigt ein normales Bild, ein anderer Teil baut sich z.T. aus Hungerfibroblasten auf, die in lockerem Verbands liegen, z.T.

können Degenerationserscheinungen beobachtet werden, wie sie bei Züchtung in optimalem Medium erst nach 120 Stunden auftreten. Auch hier sind wenige mit Hefen besiedelte Zellen vorhanden.

Versuch y (Ansatz 51) :

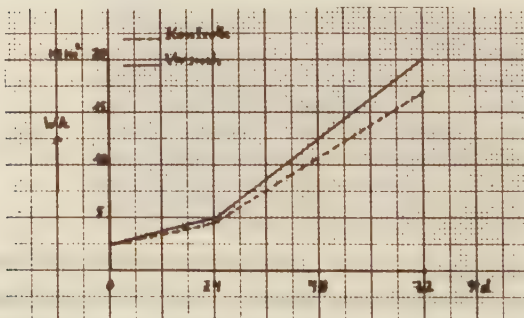
Versuchsordnung:

Kulturart: Hängender Tropfen (= Deckglaskultur);
Kulturmedium: optimal. Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonalextrakt gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz. Inkubation 72 Std.

Als Ausgangsgewebe wurden Fibroblastenkulturen verwendet, die so schlechtes Wachstum und Degenerationsmerkmale zeigten, daß man sie normalerweise von der Weiterzucht ausgeschieden hätte. Mit der Auswahl dieser Gewebe sollte gezeigt werden, daß die Symbionten auch in diesem Fall einen günstigen Einfluß ausüben.

Makroskopische Beobachtung :

Die beimpften Kulturen zeigten ein um 7 - 17 % stärkeres Wachstum als die unbeimpften Schwestergewebe (Kurve 41).



Kurve 41

Histologischer Befund :

Es herrscht Übereinstimmung der Versuchs- mit den Kontrollgewebe. Beide zeigen die gleichen Degenerationsmerkmale in Form von Verfettung, Vakuolisierung und Granulation des Plasmas, wie

vor Beginn des Versuches. Dies ist ein Zeichen dafür, daß die Symbionten zwar das Wachstum anregen, nicht aber die Degeneration rückgängig machen können.

Auch hier liegen Hefen intracellular in den Fibroblasten.

Leerversuch :

Zu jedem der Versuche (Ansatz 44 - 51) wurden Kontrollen angesetzt und zwar wurden die verwendeten Hefeaufschwemmungen ohne Fibroblastenkulturen, nur in einem Tropfen des jeweils verwendeten Kulturmediums angesetzt, um beurteilen zu können, ob die Hefen in diesem Medium, unbeeinflusst durch die Gewebe, eine stärkere Vermehrung zeigen.

Die Untersuchungen ergaben, daß eine kontinuierliche Vermehrung der Symbionten im Laufe der 72-stündigen Bebrütung stattfand. Ein Vergleich der dabei gefundenen Hefebesiedelungsdichte mit jener des entsprechenden Hauptversuches ließ völlige Übereinstimmung erkennen. Hier wie dort fand darüber hinaus keine Vermehrung der Symbionten mehr statt, ein Zeichen dafür, daß nach einer gewissen Zeit das Substrat an Nährstoffen erschöpft war. Damit harmonieren auch die Versuche mit nährstoffarmem Medium.

Diskussion der Ergebnisse :

Die Versuche ergaben im Gegensatz zu den Versuchen P u c h t a's eine, wenn auch geringe Wachstumsförderung der Fibroblastengewebe durch die symbiontischen Hefen. Bei gleichzeitigem Ansatz von Hefen und Fibroblastenkulturen und 72-stündiger Bebrütung, war sowohl bei den Carrel-, als auch bei den Deckglaskulturen eine Wachstumsförderung um ca 10 - 20 % (in einem Fall sogar 30 %) zu beobachten. Interessant ist, daß bei Ausdehnung der Versuche über 72 Stunden hinaus, keine weitere Vermehrung der Hefen über den Stand nach 72-stündiger Bebrütung

stattfind. Dies ist ein Zeichen dafür, daß nach einem gewissen Zeitpunkt die Vermehrungsbedingungen für die Hefen ungünstig wurden. Mehrere Gründe können dafür u.U. verantwortlich gemacht werden. Entweder lag, wie mehrfach diskutiert, eine reine Nahrungskonkurrenz zwischen Fibroblasten und Hefen vor, denn beide ernähren sich aus demselben Medium, oder aber die Stoffwechselbauprodukte der Gewebekulturen wirkten hemmend auf die Hefen ein. Eine Abscheidung von Hemmstoffen in das Kulturmedium durch die Fibroblastenkulturen im Sinne P u c k t a 's ist unwahrscheinlich; jedenfalls gibt es keine Anhaltspunkte dafür, daß die Fibroblasten außer ihren Stoffwechselprodukten auch noch besondere Hemmstoffe produzieren. Meine Versuche zeigen eindeutig, daß die Fibroblastenkulturen die Hefen nicht an der Vermehrung hindern. Es besteht also offenbar keine Nahrungskonkurrenz zwischen den Fibroblasten und den Symbionten.

Nach den Beobachtungen von G r ä b n e r sondern symbiotische Hefen in Diffusionskulturen Stoffe ab, die sie selbst zum Wachstum brauchen. Wenn auch vorläufig nur für die Anobidienhefen solche Beobachtungen vorliegen, so ist es doch sehr wahrscheinlich, daß auch die Bockkäferhefen sich im Kulturmedium ähnlich verhalten.

Auch spricht die gleichmäßige Besiedelungsdichte des freien Mediums und der Fibroblastenkultur gegen einen hemmenden Einfluß der Gewebekulturen. Aber möglicherweise könnten sich umgekehrt die von den Hefen produzierten Wachstoffsstoffe fördern auf das Wachstum der Fibroblastenkulturen auswirken. Um dies zu beweisen, wurde versuchsweise die Konzentration des Embryonal-extraktes, des Wachstoffsdepots für die Gewebekulturen, herabgesetzt (um ca. 20 % bei Deckglas-, wie bei Carrellflaschen-Versuchen). Tatsächlich blieben bei diesem Verdünnungsgrad die Kontrollgewebe etwas hinter den Versuchsgeweben zurück, während bei noch stärkeren Verdünnungen (um 4 %) alle Kontroll-, sowie der größte Teil der Versuchsgewebe der Nekrose anheimfielen.

Nach den bisherigen Testergebnissen symbiotischer Hefen be-

Wachstumsförderung der Fibroblastenkulturen durch die
symbiontischen Hefen aus dem Bockkäfer Rhagium bifasciatum
(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen).

Vers. Nr.	Ansatz :	Versuchszeiten:	
		24 Std.	48 Std.
5	40	hängender Tropfen (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturan- satz.	
		9 %	15 %
6	41	hängender Tropfen (Hungermedium = 1:5 verdünntes optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	
		25 %	19 %
	42	hängender Tropfen (extremes Hungerme- dium = 1:10 verdünnt- es optimales Medium) Hefeinokulation gleich- zeitig mit dem Fibro- blastenkulturansatz.	
		keinerlei Wachstum	
	43	Membranflasche: über und unter der Membran optimales Medium. Hefeinokula- tion gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	
		10 %	10 %

2. Spondylis buprestoides

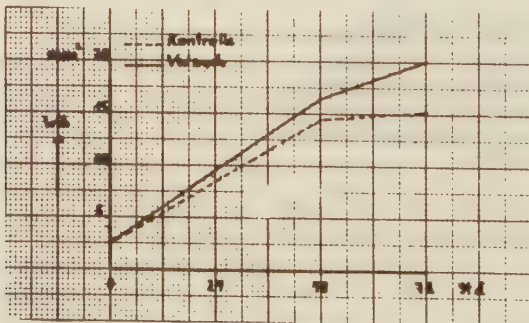
Die Hefen leben symbiontisch in den Darmblindsäcken der Larve des Bockkäfers *Spondylis buprestoides*. Die Symbionten haben eine ovale bis längliche, z.T. runde bis tropfenförmige Gestalt. Häufig sind sie in Sproßverbänden anzutreffen. Ihre systematische Stellung ist noch unbekannt, genau wie ihre Wirkstoffproduktion.

Versuch u :

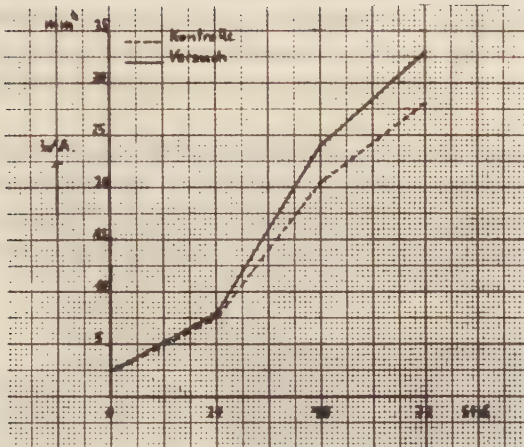
Versuchsanordnung :
Der Versuch u) wurde sowohl in der Carrelflasche (Ansatz 44) und 45)), als auch auf dem Deckglas (Ansatz 46) mit optimalem Medium durchgeführt. Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonal-extrakt gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturan-satz. Inkubation bei Ansatz 44) und 46): 72 Std bei Ansatz 45) wurde sie noch weitere 48 Std. fortgesetzt.

Makroskopische Beobachtung :

Es zeigte sich eine deutliche Wachstumsförderung der beimpften Kulturen, die bis zu 30 % betragen konnte. (Kurve 38 u. 39)



Kurve 38 (Ansatz 44)



Kurve 39
(Ansatz 46)

Histologischer Befund :

Die Hefen zeigen überall gutes Wachstum und sind gleichmäßig über Kultur und Medium verteilt. Bei allen, 72 Std. lang beeinflussten, Versuchsansätzen gleichen sich die histologischen Bilder von Versuchs- und Kontrollgewebe weitgehend. Bei einer Kultur, bei welcher durch Zufall beim Beimpfen auf die eine Hälfte der Kultur ein großer Symbiontenverband hingelange, die andere Seite aber symbiontenfrei blieb, zeigt sich kein Unterschied im Wachstum und histologischen Bild der beiden Hälften.

Nach Fortsetzung des Versuches um weitere 48 Stunden (Ansatz 45), konnte ich folgende Beobachtung machen: Die Konzentration der zugegebenen Hefeaufschwemmung entsprach genau jener von Versuchsansatz 44, da beide zur gleichen Zeit angesetzt wurden. Aber trotz der 48 Stunden längeren Bebrütungsdauer entspricht die Lagerungsdichte der Hefen jener von Versuchsansatz 44) mit nur 72 Stunden Bebrütung. Dies deutet darauf hin, daß nach einer ganz bestimmten Zeit die Vermehrung der Hefen aufhörte.

Der Grund dafür kann entweder die Erschöpfung der Nahrung des Mediums sein, oder aber Hemmstoffe der Gewebe dämmten die Vermehrung der Hefen ein. Erstere Annahme trifft wohl eher zu. - Das histologische Bild von Versuchs- und Kontrollgeweben stimmt überein. Hier wie dort bemerkt man Anzeichen einer Degeneration, wie sie bei älteren Kulturen auch normalerweise auftritt.

Bei vielen Kulturen des Versuches u) findet man im Plasma einiger Zellen, und zwar sowohl der normalen spindelförmigen, als auch der abgekugelten, symbiontische Hefen eingeschlossen. In manchen lagen nur einige wenige, in anderen dagegen mehr als ein Dutzend (Abb. 34).



Abb. 34 : Fibroblasten mit symbiontischen Hefen des Käfers *Spondylis buprestoides* als Einschlusskörperchen (340-fache Vergrößerung)

Versuch v : (Ansatz 47)

Versuchsordnung:

Kulturgefäß: Carrelflasche; Kulturmedium : optimal, Inokulation der Hefeaufschwemmung in Embryonal-extrakt 48 Stunden nach Ansatz der Fibroblastenkulturen. Inkubation 72 Stunden.

Makroskopische Beobachtung :

Die Wachstumskurve zeigt gleichen Verlauf von Kontroll- und Versuchsgewebe. Dies beweist, daß die Fibroblastenkulturen nach Ablauf der Wachstumsperiode auf die wachstumsfördernde Wirkung der Symbionten nicht mehr ansprechen.

Das histologische Bild von Versuchs- und Kontrollgewebe deckt sich mit dem von Versuchsansatz 46).

Versuch x :

Versuchsanordnung:

Der Versuch wurde sowohl in der Carrelflasche (Ansatz N 48), als auch auf dem Deckglas (Ansatz N 49 und 50) durchgeführt.

Inokulation der Hefeaufschwemmung in, dem Ansatz entsprechend verdünnten Embryonalextrakt, gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz.

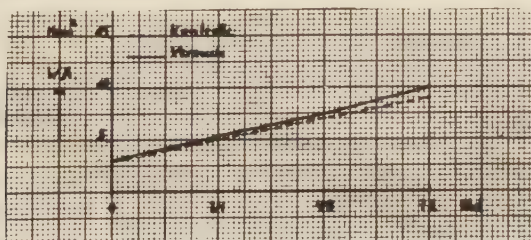
Inkubation 72 Stunden.

Zur Durchführung des Ansatzes 48) und 49) wurde "Hungermedium" (s.o.) verwendet und bei Ansatz 50) "extremes Hungermedium" (s.o.).

Makroskopische Beobachtung :

Die Kulturen der Ansätze 48) und 49) zeigten zwar Wachstum, erreichten aber nicht die Ausdehnung von Kulturen in optimalem Medium. Die Wachstumskurve läßt eine kleine Begünstigung der beimpften Kulturen erkennen (ca. 5 - 15 %) (Kurve 40).

Die Kulturen des Ansatzes 50 konnten nicht auswachsen.



Kurve 48

Histologischer Befund der Kulturen des Ansatzes 48) und 49).

Das Wachstum der Hefen ist spärlich. Ein Teil der Gewebe zeigt ein normales Bild, ein anderer Teil baut sich z.T. aus Hungerfibroblasten auf, die in lockerem Verbands liegen, z.T.

können Degenerationserscheinungen beobachtet werden, wie sie bei Züchtung in optimalem Medium erst nach 120 Stunden auftreten. Auch hier sind wenige mit Hefen besiedelte Zellen vorhanden.

Versuch y (Ansatz 51) :

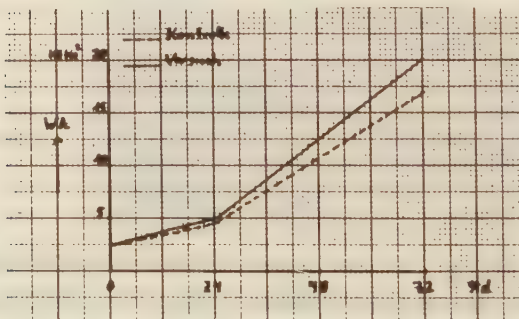
Versuchsordnung:

Kulturart: hängender Tropfen (= Deckglaskultur);
Kulturmedium: optimal. Inokulation der Hefe aufschwemmung in Embryonalextrakt gleichzeitig mit dem Fibroblastenkulturansatz. Inkubation 72 Std.

Als Ausgangsgewebe wurden Fibroblastenkulturen verwendet, die so schlechtes Wachstum und Degenerationsmerkmale zeigten, daß man sie normalerweise von der Weiterzucht ausgeschieden hätte. Mit der Auswahl dieser Gewebe sollte gezeigt werden, daß die Symbionten auch in diesem Fall einen günstigen Einfluß ausüben.

Makroskopische Beobachtung :

Die beimpften Kulturen zeigten ein um 7 - 17 % stärkeres Wachstum als die unbeimpften Schwestergewebe (Kurve 41).



Kurve 41

Histologischer Befund :

Es herrscht Übereinstimmung der Versuchs- mit den Kontrollgewebe. Beide zeigen die gleichen Degenerationsmerkmale in Form von Verfettung, Vakuolisierung und Granulation des Plasmas, wie

vor Beginn des Versuches. Dies ist ein Zeichen dafür, daß die Symbionten zwar das Wachstum anregen, nicht aber die Degeneration rückgängig machen können.

Auch hier liegen Hefen intracellular in den Fibroblasten.

Leerversuch :

Zu jedem der Versuche (Ansatz 44 - 51) wurden Kontrollen angesetzt und zwar wurden die verwendeten Hefeaufschwemmungen ohne Fibroblastenkulturen, nur in einem Tropfen des jeweils verwendeten Kulturmediums angesetzt, um beurteilen zu können, ob die Hefen in diesem Medium, unbeeinflusst durch die Gewebe, eine stärkere Vermehrung zeigen.

Die Untersuchungen ergaben, daß eine kontinuierliche Vermehrung der Symbionten im Laufe der 72-stündigen Bebrütung stattfand. Ein Vergleich der dabei gefundenen Hefebesiedelungsdichte mit jener des entsprechenden Hauptversuches ließ völlige Übereinstimmung erkennen. Hier wie dort fand darüber hinaus keine Vermehrung der Symbionten mehr statt, ein Zeichen dafür, daß nach einer gewissen Zeit das Substrat an Nährstoffen erschöpft war. Damit harmonieren auch die Versuche mit nährstoffarmem Medium.

Diskussion der Ergebnisse :

Die Versuche ergaben im Gegensatz zu den Versuchen P u o h t a's eine, wenn auch geringe Wachstumsförderung der Fibroblastengewebe durch die symbiontischen Hefen. Bei gleichzeitigem Ansatz von Hefen und Fibroblastenkulturen und 72-stündiger Bebrütung, war sowohl bei den Carrel-, als auch bei den Deckglaskulturen eine Wachstumsförderung um ca 10 - 20 % (in einem Fall sogar 30 %) zu beobachten. Interessant ist, daß bei Ausdehnung der Versuche über 72 Stunden hinaus, keine weitere Vermehrung der Hefen über den Stand nach 72-stündiger Bebrütung

stattfand. Dies ist ein Zeichen dafür, daß nach einem gewissen Zeitpunkt die Vermehrungsbedingungen für die Hefen ungünstig wurden. Mehrere Gründe können dafür u.U. verantwortlich gemacht werden. Entweder lag, wie mehrfach diskutiert, eine reine Nahrungskonkurrenz zwischen Fibroblasten und Hefen vor, denn beide ernähren sich aus demselben Medium, oder aber die Stoffwechselbauprodukte der Gewebekulturen wirkten hemmend auf die Hefen ein. Eine Abscheidung von Hemmstoffen in das Kulturmedium durch die Fibroblastenkulturen im Sinne P u c h t a 's ist unwahrscheinlich; jedenfalls gibt es keine Anhaltspunkte dafür, daß die Fibroblasten außer ihren Stoffwechselprodukten auch noch besondere Hemmstoffe produzieren. Meine Versuche zeigen eindeutig, daß die Fibroblastenkulturen die Hefen nicht an der Vermehrung hindern. Es besteht also offenbar keine Nahrungskonkurrenz zwischen den Fibroblasten und den Symbionten.

Nach den Beobachtungen von G r ä b n e r sondern symbiotische Hefen in Diffusionskulturen Stoffe ab, die sie selbst zum Wachstum brauchen. Wenn auch vorläufig nur für die Anobidenhefen solche Beobachtungen vorliegen, so ist es doch sehr wahrscheinlich, daß auch die Bockkäferhefen sich im Kulturmedium ähnlich verhalten.

Auch spricht die gleichmäßige Besiedelungsdichte des freien Mediums und der Fibroblastenkultur gegen einen hemmenden Einfluß der Gewebekulturen. Aber möglicherweise könnten sich umgekehrt die von den Hefen produzierten Wachstumsstoffe fördernd auf das Wachstum der Fibroblastenkulturen auswirken. Um dies zu beweisen, wurde versuchsweise die Konzentration des Embryonalextraktes, des Wachstoffsdepots für die Gewebekulturen, herabgesetzt (um ca. 20 % bei Deckglas-, wie bei Carrelflaschen-Versuchen). Tatsächlich blieben bei diesem Verdünnungsgrad die Kontrollgewebe etwas hinter den Versuchsgeweben zurück, während bei noch stärkeren Verdünnungen (um 4 %) alle Kontroll-, sowie der größte Teil der Versuchsgewebe der Nekrose anheimfielen.

Nach den bisherigen Testergebnissen symbiotischer Hefen be-

steht kein Zweifel, daß auch von den Hefen des Bockkäfers *Spondylis buprestoides*, welche bisher noch nicht gepüft wurden, Wachstumsvitamine der B - Gruppe erzeugt werden.

Es wäre aber auch noch an die Möglichkeit zu denken, daß ein Teil der Hefen während des Versuches abstirbt und dabei hochwertige Eiweiße frei werden, die dann den Fibroblasten zur Ausnützung zur Verfügung stehen. Jedoch habe ich selbst bisher keine toten Hefen mit Sicherheit nachweisen können.

Offenbar sind symbiontische Hefen nicht im Stande, die Degenerationerscheinungen einer Fibroblastenkultur bei langer Züchtungsdauer (120 Stunden) aufzuhalten. Die Hefen von *Spondylis buprestoides* vermögen demnach nicht die Abbauprodukte einer Fibroblastenkultur in ähnlichem Maße zu beseitigen, wie das die Chlorellen der Buchsbaum'schen Versuche zweifellos taten.

Wachstumsförderung der Fibroblastenkulturen durch die symbi-
ontischen Hefen aus dem Bockkäfer Spondylis buprestoides
(am Areal in % gemessen, bezogen auf Kontrollkulturen).

Kurven- Nr.	Vers. Nr.	Ansatz:	Versuchszeiten:			96 und 120 Std.
			24 Std.	48 Std.	72 Std.	
38	44	Carrelflasche: (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	14 %	16 %	27 %	---
—	45	Carrelflasche: (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	15 %	15 %	20 %	30 %
39	46	hängender Tropfen: (optimales Medium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	9 %	16 %	17 %	---
—	47	Carrelflasche: (optimales Medium) Hefeinokulation 48 Std. nach dem Fibroblastenkultur- ansatz.	gleicher Wachstumsstand von Kontroll- und Ver- suchsgewebe.			---
40	48	Carrelflasche: (Hungermedium) Hefeinokulation gleichzeitig mit dem Fibroblastenkultur- ansatz.	5 %	10 %	15 %	---
40	49	hängender Tropfen: (Hungermedium) Hefe- inokulation gleich- zeitig mit dem Fibroblasten- kulturansatz.	5 %	10 %	10 %	--
—	50	hängender Tropfen: (extremes Hungermedium) Hefeinokulation gleich- zeitig mit dem Fibrobla- stenkulturansatz.	weder Kontroll- noch Ver- suchsgewebe zeigen Wachs- tum.			---
41	51	hängender Tropfen: (optimales Medium) Hefe- inokulation gleichzeitig mit dem Ansatz geschädig- ter Fibroblastenkulturen.	7 %	15 %	17 %	---

In allen Fällen (Versuch a - y) war schließlich noch der Nachweis zu erbringen, daß die Bakterien und Hefen nach Ablauf der Versuche noch lebens- und teilungsfähig waren. Solch ein Nachweis ist ja leicht zu führen, wenn man nach Versuchsabschluß Proben der Mikroorganismenaufschwemmung entnimmt und sie auf Schrägagar abimpft. In allen Fällen zeigte sich einwandfrei Wachstum. Von einer Schädigung der Mikroorganismen durch die Gewebekulturen kann daher keine Rede sein.

Schlußbetrachtungen :

Versucht man, all die verschiedenen Experimente, die ich im Rahmen meiner Untersuchungen anstellen konnte, unter einem einheitlichen Gesichtspunkt zu betrachten, so lassen sich unschwer zwei große, voneinander deutlich unterscheidbare Kategorien sondern:

1.) Beeinträchtigung und 2.) Förderung des Fibroblastenwachstums. Bakterien und nichtsymbiontische Hefen wirkten sich stets *s c h ä d i g e n d* auf die Fibroblastenkultur aus. Geht man den Ursachen dieses verderblichen Einflusses nach, dann ergeben sich unter vielen, vor allem zwei Möglichkeiten. 1.) Nahrungskonkurrenz, 2.) Stoffwechselgifte.

Zu 1): Die Mikroorganismen könnten dem gemeinsamen Kulturmedium Nährstoffe entzogen und die Fibroblasten somit ausgehungert haben. Es bestünde aber auch die Möglichkeit, daß die Bakterien und Hefen ein günstiges Milieu vorfanden und die Fibroblasten nur durch die räumliche Bedrängung am Wachstum hinderten.

Zu 2): Es könnte sein, daß Stoffwechselgifte der Bakterien oder Hefen die Ursache der Wachstumshemmung der Fibroblasten waren. Allerdings müßte man dabei bedenken, daß nicht alle geprüften Mikroorganismen gleichwirkende Stoffwechselprodukte besitzen, denn in einigen Fällen konnte ich ja keine Hemmung, sondern eine Förderung notieren.

Eine Entscheidung, ob die eine oder andere Erklärung zulässig ist, kann nur von Fall zu Fall getroffen werden. So fanden z.B. *K i m u r a* und *I s c h i i* (l.c. 14), sowie *K r o n t o w s k i* (l.c. 18), daß Bakterienfiltrate das Wachstum der Fibroblasten hemmen, ein Beweis dafür, daß Hemmstoffe vorliegen müssen.

In eigenen Untersuchungen habe ich feststellen können, daß die Bakterienfiltrate nicht immer hemmten, auch da, wo die

unmittelbare Inkubation der Fibroblasten mit den entsprechenden Mikroorganismen sich ungünstig erwies. In diesem Fall hätte man anzunehmen, daß ein Hemmstoff nicht filtrierbar, oder nur in direktem Kontakt wirksam war. Auch eine Versuchsanordnung von R. M e i e r (l.c. 15), welcher in einem "festen Medium" arbeitete und die Bakterien an die eine Seite der Fibroblastenkultur einimpfte, erlaubt keine Entscheidung im Sinne meiner Fragestellung.

Aus diesem Grunde zog ich die Membranflasche zu Parallelversuchen heran. Mit dieser Versuchsanordnung, welche eine Trennung von Fibroblasten und Mikroorganismenkultur ermöglicht, ist es vielleicht leichter, eindeutige Antworten auf die gestellten Fragen zu bekommen. Wenn auch die Mehrzahl der Versuche für die Existenz von Hemmstoffen sprach, so war es mir doch in einigen Fällen nicht möglich, eine Entscheidung zu treffen.

Interessant wäre auch die Feststellung einer Korrelation zwischen Fibroblastenschädigung und biochemischer Charakteristik der verwendeten Bakterienarten. So könnte man sich fragen, ob besonders hochgradige Fibroblastenschädigung durch eiweißzersetzende Bakterien beobachtet werden kann. Wachstumshemmend auf die Fibroblastenkulturen bei direktem Kontakt erwiesen sich folgende Bakterienstämme: *Escherichia paracoli*, *Pseudomonas pyocyaneum*, *Bacterium proteus* und der *Bacillus subtilis*. Von diesen sind die drei letztgenannten Eiweißzer-setzer, sie können Gelatine verflüssigen. - Sie brachten sowohl frisch angesetzte, als auch schon 48 Stunden lang ^{un}beeinflusst durch die Keime gewachsene Fibroblastenkulturen unter Auflösungserscheinungen zum Absterben.

Bei Zwischenschalten einer Cellophanmembran wurde bei allen drei Bakterienstämmen das Wachstum der Fibroblastenkulturen sehr stark gehemmt, aber nur bei *Bacterium proteus* waren bei dieser Versuchsanordnung ausgesprochene Auflösungserscheinungen festzustellen.

Auch bei direktem Kontakt der Fibroblastenkulturen mit *Bacterium paracoli* fand eine völlige Wachstumshemmung statt.

Da *E. paracoli* keine oder nur sehr geringe proteolytische Fähigkeiten besitzt, muß man wohl seine toxischen Eigenschaften dafür verantwortlich machen. Beim Zwischenschalten einer Cellophanmembran fand auch noch starke Wachstums-
hemmung statt.

Sehr stark wachstumshemmend, sowohl bei direktem Kontakt, als auch bei Zwischenschalten einer Membran, wirkte *Bacterium aerobacter aerogenes* jedoch nicht so, daß überhaupt kein Wachstum zustande käme. *Aerobacter* scheidet keine proteolytischen Enzyme aus.

Mäßig wachstumshemmend wirkten *Bacterium faecalis alcaligene*, *Torula utilis* und *Candida albicans*, sowohl bei direktem Kontakt als auch bei Zwischenschalten einer Membran. *Candida albicans* wirkte, wenn gesunde Kulturen und optimales Medium gewählt wurden, weder bei direktem Kontakt und erst recht nicht bei räumlicher Trennung schädigend. Wurden aber geschwächte Kulturen oder Hungermedium gewählt, trat eine Schädigung, aber keine Abtötung auf.

Eine besondere Beachtung verdient schließlich die Feststellung, daß die symbiontischen Hefen gegenüber den Fibroblasten sich unschädlich erweisen, ja sogar sie aktivieren können. Es ist gerechtfertigt, darin einen Ausdruck für eine echte Symbiose, hier zwischen Hefe und isolierten Gewebeelementen, zu erblicken, wenngleich mir eine Dauerkultur zwischen beiden, womöglich mit positivem Wachstumserfolg, bisher nicht gelungen ist.

Es wäre naheliegend, die Wachstumsförderung der Gewebekulturen in diesen Versuchen auf die Erzeugung von Wirkstoffen des Vitamin - B - Komplexes durch symbiontische Hefen zurückzuführen. Aus zeitlichen Gründen konnte ich aber diesen Nachweis nicht mehr führen. Es soll die Aufgabe einer künftigen Arbeit sein, auf breiterer Basis derartige Versuche anzustellen, welche nicht nur für die Naturwissenschaftler, sondern auch für die Mediziner von großem Interesse sind.

Da ein so komplizierter Nährboden, wie es der Embryonalextrakt des Hühnchens ist, alle lebensnotwendigen Faktoren für die Fibroblasten enthält, kann es sich also nur um zusätzliche additive Stoffe aus den Symbionten handeln. Sicher lassen sich bei künftigen Versuchen auch zellfreie Extrakte aus symbiontischen Hefen als solche Wachstumsstimulantien anwenden.

Zusammenfassung .

- I. Einleitend wird nach Erläuterung der Fragestellung zum Thema ein Überblick über die vorhandene Literatur gegeben.
- II. In eigenen experimentellen Untersuchungen wird unter Anwendung der Methode der Gewebszüchtung (Deckglas-, Carrelflaschen- und Membranflaschenkulturen) der Einfluß von Bakterien auf Fibroblasten studiert und gefunden, daß
 - a) *Escherichia paracoli*, *Pseudomonas pyocyaneum*, *Bacterium faecalis alcaligenes*, *Bacterium proteus*, *Bacterium aerobacter aerogenes* und *Bacillus subtilis* die Fibroblasten schädigen,
 - b) die Schädigung graduell verschieden ist. Es erleidet nicht nur das Wachstumsareal der Fibroblastenkulturen eine Einbuße, sondern es lassen sich auch morphologische Veränderungen an den Fibroblasten nachweisen : Degenerationerscheinungen von Kern und Plasma, die bis zu einer völligen Auflösung der Zellen führen,
 - c) besondere Formen der Zellreaktionen als Ausdruck degenerativer Veränderungen bestehen.
- III. Einige Hefen, und zwar *Candida albicans* und *Torula utilis*, werden in gleicher Weise wie die unter II genannten Bakterien untersucht. Auch hierbei ist eine Wachstumshemmung festzustellen, die aber geringer ist, als bei Bakterieninokulation. Die morphologischen Veränderungen der Fibroblasten werden beschrieben.
- IV. Symbiontische Hefen (aus den Bockkäfern *Rhagium bifasciatum* und *Spondylis buprestoides*) zeigen keine Hemmung, sondern eine gut feststellbare Aktivierung des Fibroblastenwachstums, die besonders dann deutlich ist, wenn Fibroblasten aus schlecht wachsenden Stämmen Verwendung finden. Einige

kennzeichnende morphologische Veränderungen, besonders die Aufnahme intakter symbiontischer Hefen in die intakten Fibroblasten, werden gezeigt und erläutert.

- V. Von den möglichen Ursachen der Schädigungen des Fibroblastenwachstums werden zwei diskutiert und zwar die Frage der Existenz von mehr oder minder spezifischen, aus dem Bakterienstoffwechsel stammenden Hemmstoffen, und die Frage nach einer Konkurrenz von Nährstoff zwischen Bakterien und Fibroblasten.

Literatur

1. B u c h n e r P. : Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Basel 1953.
2. K e c h A. : Über künstlich symbiontenfrei gemachte Insekten. Verh. dtsh. zool. Ges. 1933, 143 - 150
3. " " Wachstumsfördernde Wirkstoffe der Hefe Naturwiss. 28, 24 - 27, 1940
4. " " Untersuchungen über Wachstumsaktivatoren. Verh. Dtsch. Zoologen Marburg 1950. Zool. Anz. Suppl. 15, 51 - 58 (1950)
5. " " Biologische und medizinische Probleme der Stoffwechselphysiologie symbiontischer Mikroorganismen. Münch. med. Wschr. 1951, Sp. 696 - 704
6. S m y t h H.F. : The influence of bacteria upon the development of tissues in vitro. Zentr. Bakt. 1. Abt. Orig. 76 : 12 - 23, 1915
7. " " The reactions between bacteria and animal tissues under conditions of artificial cultivation. J. Exper. Med. 21 : 103 - 113, 1915
8. " " The reactions between bacteria and animal tissues under conditions of artificial cultivation. II. Bactericidal action in tissue cultures. J. Exper. Med. 23 : 265 - 274. 1916
9. " " The reactions between bacteria and animal tissues under conditions of artificial cultivation. III. The actions of bacterial vaccines on tissue culture in vitro. J. Exper. Med. 23 : 275 - 281, 1916
10. C a r r e l A. : Die Kultur der Gewebe außerhalb des Organismus. - Berlin, Klin. Wochenschr. 48: 1364 - 1367, 1911
11. S m y t h H.F. : The reactions between bacteria and animal tissues under conditions of artificial cultivation. IV. The cultivation of tubercle bacilli with animal tissues in vitro. J. Exper. Med. 23: 283 - 291, 1916

12. T a n n e n b e r g Jos.: Über die Entwicklungspotenzen der Fibroblasten in der Gewebekultur. II. Mitteilung: Das Verhalten von Fibroblastenreinkulturen bei bakterieller Infektion. Arch. f. exp. Zellf. Bd. 9, 1929/30, S.258-268
13. F i s c h e r Albert : Umwandlung von Fibroblasten zu Makrophagen in vitro. Arch. f.exp. Zellf. Bd.3 1927, S. 345 - 352.
14. K i m u r a Ren. und
I s c h i i Tatsuji : Wirkung der Bakterien und Schlangengifte auf gezüchtete Gewebe in vitro. Arch.f. exper. Zellf. Bd 10 1930, S. 101 - 108
- P i n u s A. : Die Reaktion der Gewebekultur auf Inokulation mit Bakterium mallei. Arch. f. experimentelle Zellf. Bd. 10, 1930, S. 109 - 112.
15. M e i e r Rolf : Methoden zur Untersuchung der Wirkung von Stoffwechselprodukten lebender Bakterien auf Wachstumsvorgänge von Gewebekulturen. Arch. f. exper. Zellf. Bd. 12.1931/32, S. 595 - 601
16. " " : Über den Einfluß von Bakteriengiften auf isolierte Zellen und Gewebe. Arch. f. exper. Zellf., Bd.15 1934 S. 67 - 71
17. K i m u r a R. und
I s c h i i T. : Gewöhnung der Fibroblasten an Bakterien und Schlangengifte (Studien in der Gewebezüchtung). Zeitschr. Immunitätsforsch. exper. Therap.67: 111 - 114, 1930
18. K r o n t o w s k i AA: Quantitative Untersuchungen über die Wirkung des Diphtherietoxins auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Gewebekulturen. Zentr. Bakt 1. Abt. Orig. 117 : 328 - 343, 1930
19. W a l l b a c h G. : Die reaktiven Erscheinungen an der menschlichen Leukocytenkultur auf Grund einiger Infekte. Arch.exper. Zellf. 17 : 177 - 205, 1935.
20. V o l l m a r H. und
K n ö l l H. : Untersuchungen über die Wirkung von Bakterien und Bakteriophagenpräparaten auf Carcinom und Normalgewebe in der Gewebekultur. Zeitschr.Krebsforsch.55:26 -56,1944

21. Maximow A.A. : The histogenesis of tubercle.
Nat. Tuberc. Assoc. Trans: 21 :
342 - 346, 1925
22. Fischer Albert : Gewebezüchtung 3. Ausgabe.
München 1930, Verlag Rudolph Mül-
ler & Steinicke.
23. Timofeevskii
A.D.: Kulturen tkanini leukotsitiv
liudini Calmett'a. Die Kultur von
Gewebe und Leukocyten der Menschen
mit Tbc Calmette. Ukrain med.arkh.
2 : 86 - 97, 1928
24. " " : Über Tuberkelinfektion von Gewebe-
kulturen Arch. exper. Zellforsch.
6 : 230 - 234, 1928
25. " " and :
Benevolenskaja
S.V.: Kultivierungsversuche der von Tu-
berkelbacillen infizierten Zellen-
gewebe. Tomsk. Gosudarst. inst.
usovershenst. vrach. Izvest. 73:
304 - 305, 1924.
26. --- and --- Explantationsversuche von weißen
Blutkörperchen mit Tuberkelbacillen
Arch. exper. Zellforsch. 2 : 31-42,
1926.
27. --- and --- Tuberculous inoculation in the cul-
tures of Leukocytes of the human
blood. Arch.exper. Zellforsch. 4:
64 - 78, 1927.
28. Timofeevskii A.D. and
Benevolenskaja
S.V.: Zur Frage über die Reaktion patho-
logischer Leukocytenformen des Men-
schenblutes in vitro auf Tuberkel-
bacillen. Virchows Arch. path. Anat.
Physiol. klin. Med. 264 : 605-617
1927
29. --- and --- : Züchtung von Geweben und Leukocyten
des Menschen mit Tuberkelbacillen
Calmettes (BCG). Virchows Arch.path.
Anat. Physiol.klin.Med. 268: 629-65
1928
30. Smith D.T. : The behavior of cultures of chick
Willis H.S. embryo tissue containing avian tu-
Lewis M.R. bercle bacilli. Am. Rev. Tuberc.
6 : 21 - 34, 1922 - 1923.

31. H a a g e n E. : Das Verhalten von Lungengewebskulturen gegenüber Tuberkelbasillen. Arch. exper. Zellforsch. 5: 157 - 168, 1927 - 1928.
32. L e w i s W.H. and
W e b s t e r L.T. : Giant cells in cultures from human lymph nodes. J. Exper. Med. 33 : 349 - 360, 1921
33. L e w i s W.H. : Binucleate cells and giant cells in tissue cultures and the similarity of the latter to the giant cells of tuberculous lesions. Tubercle 8 : 317 - 330, 1926 - 1927.
34. " " : The formation of giant cells in tissue cultures and their similarity to those in tuberculous lesions. Am. Rev. Tuberc. 15 : 616 - 626, 1927.
35. L e w i s M.R.
W i l l i s H.S. and
L e w i s W.H. : The epithelioid cells of tuberculous lesions. Johns Hopkins Hosp. Bull. 36 : 175 - 184, 1925.
36. C a s t r ö n H. : Studien über die Struktur der Fibroblasten, Epithelioidzellen und Riesen zellen des tuberkulösen Gewebes beim Menschen. Jena, G.Fischer 1923. 84 p.
37. A r o n s o n J.D. : The specific cytotoxic action of tuberculin in tissue culture. J. Exper. Med. 54 : 387 - 397, 1931.
38. V e r m e l E.M. : Reaktion der Zellen auf Tuberkelinfektion in den Gewebekulturen. Virchows Arch. path. Anat. Physiol. klin. Med. 281 : 297 - 315, 1931
39. A l l g ö w e r M. and
B l o c h H. : The effect of tubercle bacilli on the migration of phagocytes in vitro. Am. Rev. Tuberc. 59 : 562 - 566, 1949
40. F i s c h e r I. : Grundriß der Gewebezüchtung. Verlag v. Gustav Fischer in Jena 1942
41. F i s c h e r A. : Gewebezüchtung (Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro). Verlag Rudolph Müller & Steinicke (München) 1927.
42. B a u e r K.F. : Methodik der Gewebezüchtung. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 1954

43. B a n d i e r J. und
B a y e r l e H. : Ein neues Gefäß zur Zellzüchtung auf semipermeablen Membranen. Naturwissenschaften 1954, Heft 17, S. 404 - 405, 41. Jg.
44. R u n j a n t z e w A. : Cytologische Studien an den Gewebekulturen in vitro. I. Mit teilung:Veränderungen der protoplasmatischen Strukturen bei der Zelldeneration in vitro. Arch. exper. Zellforsch. 1927 Band 4, S. 337 - 352.
45. K i m u r a Ren. : Über Einflüsse der Stoffwechselprodukte auf das Gewebewachstum in vitro. Arch. f. exp. Zellf. Bd. 7. 1928, S. 98 - 101.
46. R i e s E. und
G e r s c h M. : Biologie der Zelle. B.G.Teubner Verlagsgesellsch. Leipzig 1952
47. B ü c h n e r F. : Allgemeine Pathologie. Urban & Schwarzenberg/München Berlin, 1950.
48. B o r s t Max : Pathologische Histologie. Leipzig, Verlag von F.C.W.Vogel 1922.
49. R o m e i s Benno : Mikroskopische Technik, München 1948, Leibniz Verlag.
50. T i l l m a n n s J. -
O h n e s o r g e G. : Praktikum der klinischen, chemischen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden. Urban & Schwarzenberg Berlin und München 1947.
51. M ü l l e r R. : Medizinische Mikrobiologie. Urban & Schwarzenberg / Berlin u. München, Wien 1946.
52. R o l l e M. : Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1949.
53. H a l l m a n n L. : Bakteriologie und Serologie 2. Auflage 1955, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
54. v. M ü l l e n d o r f f M. : Phagocytoseversuche mit Fibrinblasten. Arch. f. Zellforsch. und mikroskop. Anat. 1931 Bd. S. 161 - 181.

55. Dietrich, A. : Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, 1. Bd. Allgemeine Pathologie. 8. Aufl. S. Hirzel, Leipzig 1948
56. Hamperl, H. : Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. 18. und 19. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1950.
57. Gräbner, Karl-Erich : Vergleichende morphologische und physiologische Studien an Anobiden- und Cerambyciden-Symbionten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere, Bd. 41, S. 471 - 528, 1954
58. Buchsbaum, R. and Buchsbaum, M. : An artificial symbiosis. Sci. 80 408 1934
59. Puchta, O. : Experimentelle Symbiosenuntersuchungen an Gewebekulturen von Hühnerfibroblasten. Arch. f. Mikrobiologie, Bd. 21 S. 255 - 266, 1955.
60. Niethammer, A. : Technische Mykologie, Hefen u. Schimmelpilze Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1947.
61. Heitz, E. : Über intracelluläre Symbiose bei holzfressenden Käferlarven Z. Morph. Ökol. Bd. 7, 1927
62. Schwartz, W. : Untersuchungen über Pilzsymbiose der Schildläuse Biol. Zbl. , Bd. 44 1924
63. Blewett, M.G. and Fraenkel, G. : Intracellular symbiosis and vitamin requirements of two insects, Lasioderma serricorne and Sitodrepa paniceae. Proc. Roy. Soc., London Bd. 132 1944
64. Buchner, P. : Tier u. Pflanzen in Symbiose Berlin, Borntraeger 1930 .

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor
Dr. A. K o c h , danke ich ergebenst für die Thema-
stellung und die Übernahme des Referates, sowie für
sein stetes Interesse und Ratschläge, die er der Arbeit
in allen Phasen entgegenbrachte.

Herrn Professor Dr. W. B ü n g e l e r, Direktor
des Pathologischen Institutes der Universität München,
bin ich für die Überlassung von Arbeitsplätzen in der
Chemischen Abteilung und in der Abteilung für experi-
mentelle Zellforschung dieses Institutes zu besonderem
Dank verpflichtet.

Den Herren, Dr. phil. Dr. med. B a y e r l e,
Dr. phil. Dr. med. H. W r b a und Dr. phil. Dr. med.
J. B a n d i e r danke ich für zahlreiche Ratschläge.

Lebenslauf.

Am 6. Mai 1930 wurde ich zu Lauban in Schlesien als Tochter des Augenarztes Dr. med. Wilhelm P u t z a r und seiner Ehefrau Ursula Putzar geb. Kayser, geboren. Ich besuchte dort die Volksschule und anschließend das Lyceum. Im Februar 1945 mußten wir fliehen und kamen am 20. Februar 1945 nach Nördlingen, wo ich ein Jahr später, als die Schulen wieder eröffnet wurden, bis 1948 die Oberschule für Mädchen und anschließend zwei Jahre die Oberrealschule mit Gymnasium Nördlingen besuchte. 1950 legte ich die Reifeprüfung ab.

Seit dem Wintersemester 1951/52 studiere ich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München Zoologie mit den Nebenfächern Botanik und Bakteriologie.

Ich gedenke mein Studium mit der Promotion zum Dr. phil. mit der vorliegenden Dissertation abzuschließen.

